



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Cognitive, Psicologiche, Pedagogiche e degli Studi Culturali

Dottorato di Ricerca in Scienze cognitive

XXIX CICLO

Studi neurofisiologici e neuropsicologici degli effetti del trattamento combinato della stimolazione transcranica a correnti dirette (tDCS) e del potenziamento cognitivo sul recupero funzionale dei deficit cognitivi e sui processi di neuroplasticità nelle patologie in fase cronica.

Dottorando:

Antonio Gangemi

Supervisor della tesi:

Ch.ma Prof.ssa Rosa Angela Fabio

Ch.ma Prof.ssa Alessandra Falzone

Coordinatore del Dottorato:

Ch.mo Prof. Antonino Pennisi

DOTTORATO IN SCIENZE COGNITIVE XXIX CICLO

(2013-2014)

*Credo che il mio cervello, sostanzialmente, sia lo stesso di quando ero vent'enne.
Il mio modo di esercitare il pensiero non è cambiato negli anni. E non dipende certo da una mia
particolarità, ma da quell'organo magnifico che è il cervello.
Se lo coltivi funziona, se lo lascia andare e lo metti in pensione si indebolisce.
La sua plasticità è formidabile. Per questo bisogna continuare a pensare.*

Rita Levi Montalcini

Indice

Introduzione.....	6
Parte prima	
1.La plasticità cerebrale.....	9
1.1 Natura (geni), ambiente (adattamento) e periodo critico.....	9
1.2 Esperienza e cambiamento della plasticità del sistema nervoso centrale.....	10
1.3Ruolo dei fattori di accrescimento neuronali (neurotrofine) nei processi di neuro plasticità.....	12
1.4 Sviluppo e neuro plasticità.....	13
1.5 Neuroplasticità esperienza dipendente dal sistema nervoso.....	14
1.6 Meccanismi della plasticità neurale a lungo termine.....	15
1.7 Plasticità nei mammiferi adulti	20
1.8 Plasticità delle mappe sensoriali nei primati adulti	22
1.9Plasticità nelle lesioni cerebrovascolari.....	22
Parte seconda	
2.La stimolazione Transcranica a Correnti Dirette (tDCS).....	24
2.1 Modalità di funzionamento della tDCS	25
2.2Campi di applicazione	26
Parte terza	
3.La Sindrome di rett.....	30
3.1 Tratti clinici della forma classica.....	32
3.2 Tratti clinici delle forme varianti.....	32
3.3 Genetica nella Rett.....	33
3.4 Ruolo del gene MECP2 nello sviluppo dei neuroni	35
3.5 Il geneCDKL5.....	35
3.6 Analisi mutazionale.....	37
3.7 Il gene FOXP1	38
3.8 Struttura e funzioni di FOXP1.....	38
3.9 L'instabilità neuronale : il ruolo delle neurotrofine nella patogenesi della sindrome di Rett.....	40
3.10 Le neurotrofine nella Rett.....	40
Parte terza sezione sperimentale (studio 1)	
3.11Effetti neurofisiologici e cognitivi della tdcS e del potenziamento cognitivo nella sindrome di Rett.....	42
3.11.1Obiettivi.....	42
3.11.2 Partecipanti.....	43
3.12 Strumenti.....	44

3.12.1 Scale di Vineland	44
3.12.2 Rett Assessment Rating Scales (R.A.R.S).....	45
3.12.3 Matrici progressive di Raven.....	47
3.12.4 Test di Fanzago.....	48
3.12.5 Strumenti per la valutazione neurofisiologica (EEG).....	49
3.13 procedura sperimentale.....	50
3.14 Protocollo di neurostimolazione.....	50
3.14.1 Protocollo del potenziamento cognitivo linguistico.....	51
3.14.2 Modalità di codifica.....	51
3.15 Analisi statica dei risultati.....	53
3.16 Discussioni.....	57
Parte terza sezione sperimentale (studio 2)	
Studio sperimentale ed estensione dei risultati sul rapporto fra potenziamento cognitivo e tDCS nella sindrome di Rett.....	58
3.17 Obiettivi.....	58
3.17.1 Partecipanti.....	58
3.17.2 Materiali e procedure.....	58
3.18 Analisi esplorativa.....	59
3.18.1 Analisi statistica.....	60
3.18.2 Analisi dati EEG.....	63
3.19 Discussione.....	64
Parte quarta	
I disturbi del linguaggio acquisiti: l'afasia di Broca.....	65
4 Introduzione.....	65
4.1 Afasia di Broca.....	66
4.2 Afasia di Wernicke.....	67
4.3 Afasia di conduzione.....	67
4.4 Le afasie transcorticali.....	68
4.5 Altre aree cerebrali coinvolte nel linguaggio.....	68
Parte quarta sezione sperimentale	
Effetti della tDCS e del potenziamento del linguaggio in pazienti affetti da afasia di Broca in fase cronica	
4.6 Obiettivi.....	70
4.6.1 Soggetti.....	71
4.6.2 Disegno sperimentale.....	72
4.6.3 material e metodi.....	72
4.7. Procedura sperimentale protocollo tDCS.....	73
4.7.1 Protocollo di potenziamento del linguaggio.....	73

4.8 analisi esplorativa.....	74
4.8.1 Analisi statistica.....	83
4.9 Discussioni.....	87
Parte quinta	
La malattia di Alzheimer	
5.Introduzione.....	88
5.1Aspetti clinici.....	88
5.2Fisiopatologia.....	89
5.3Eziopatogenesi della demenza di Alzheimer.....	93
5.4Fattori di Rischio.....	95
5.5Diagnosi della demenza tipo AD.....	97
5.5.1Test cognitivi nella valutazione del paziente AD.....	100
5.5.2 Diagnostica neuroradiologica.....	103
5.5.3La diagnostica neurofisiologica nella demenza di Alzheimer.....	104
5.6 La terapia farmacologica.....	105
Parte quinta: sezione sperimentale	
Effetti cognitivi e neurofisiologici di cicli ripetuti di tDCS nella demenza di Alzheimer	
5.7Obiettivi	107
5.7.1partecipanti.....	107
5.7.2protocollo di valutazione.....	108
5.7.3Strumenti di valutazione neurofisiologica	109
5.7.4 Strumenti di stimolazione transcranica.....	110
5.8 Valutazione neuro-cognitiva	110
5.9Risultati analisi esplorative.....	115
5.9.1Analisi statistica.....	121
5.10 Discussione.....	126
6.Conclusioni.....	127
Bibliografia	128

Introduzione

Il progressivo innalzamento dell'età media, fattori di tipo genetico e ambientale hanno contribuito all'aumento nel corso degli ultimi decenni, di sempre più numerose patologie che colpiscono il sistema nervoso centrale. Molte di esse sono gravi e invalidanti e i meccanismi che le regolano sono ancora poco conosciuti. Naturalmente, a livello del sistema nervoso centrale, l'organo più colpito è soprattutto l'encefalo, sede di processi motori e cognitivi che caratterizzano l'uomo. È dunque risultato necessario intraprendere delle ricerche in ambito scientifico al fine di far luce sui meccanismi che contraddistinguono il funzionamento cerebrale. A questo scopo negli ultimi anni si è assistito a un rapido progresso nell'ambito delle neuroscienze cognitive per quanto riguarda le tecniche di neuromodulazione cerebrale non invasiva NIBS (Non Invasive Brain Stimulation) che hanno cercato di sopperire alle cure farmacologiche là dove risultavano inefficaci. Queste tecniche hanno il vantaggio di garantire un'analisi accurata, sia di tipo fisiologico che comportamentale, in diverse applicazioni risultando allo stesso tempo totalmente non invasive e prive di importanti effetti avversi. Tra le varie possibilità spiccano in particolare per le loro applicazioni cliniche e il loro impiego in ambito sperimentale la stimolazione transcranica con corrente diretta (tDCS) e la stimolazione magnetica transcranica (TMS). La tDCS è una metodica conosciuta da tempo che oltre che per finalità di ricerca, ha trovato utilizzo anche in ambito clinico e riabilitativo per il trattamento di patologie neurologiche e psichiatriche. In particolare, il suo funzionamento avviene mediante l'applicazione sullo scalpo di elettrodi eroganti corrente elettrica, ad un'intensità non pericolosa e non percepibile dal soggetto. Gli effetti da essa provocati, benché transitori, persistono anche dopo la fine della stimolazione e agiscono nella direzione di un aumento o di una diminuzione dell'eccitabilità neuronale, in base all'utilizzo di una carica anodica (positiva) o catodica (negativa). Mediante la modulazione dell'attività corticale, tale metodica ha la potenzialità di incrementare le performance cognitive e motorie in soggetti sani, e di trovare utilità anche nel trattamento di quelle patologie caratterizzate da un'alterazione della elettrocorticogenesi cerebrale (Pilaz & Silver, 2015). Il principio sottostante le procedure di stimolazione è quello della plasticità sinaptica, una proprietà intrinseca del cervello umano che gioca un ruolo cardine non solo nel periodo dello sviluppo neurale ma anche in seguito a lesione cerebrale acquisita (Turriano, 2004; Villamar, 2012). I possibili meccanismi alla base degli effetti della tDCS possono essere spiegati attraverso il potenziamento e la depressione a lungo termine (after effect) della trasmissione sinaptica corticale o di meccanismi neuronali strettamente connessi ad essa. Studi su animali suggeriscono, inoltre, che la modulazione dei neurotrasmettitori e l'induzione genica possano contribuire a spiegare alcuni degli effetti modulatori a lungo termine (Keck e coll., 2000). Diversi studi sugli effetti terapeutici della tDCS stanno fornendo incoraggianti risultati (Berardelli e coll., 1998; Chen e coll., 1997; Fuggetta e coll., 2008; Ridding and Rothwell 2007) ed i recenti sviluppi nella coregistrazione EEG tDCS hanno dato nuova luce allo studio della reattività corticale nell'uomo (Brignani e coll. 2008; Fuggetta e coll. 2008; Plewnia e coll., 2008; Manganotti e coll., 2012). Evidenze da studi elettrofisiologici sulla stimolazione transcranica della corteccia motoria primaria (M1) suggeriscono un progressivo aumento dell'eccitabilità dei circuiti locali ma non solo.

Variazioni remote dell'attività cortico-subcorticale, incluse le aree associative, il talamo, il nucleo caudato ed il putamen possono essere coinvolti nella stimolazione. La natura dell'effetto a lungo raggio della tDCS non è a tutt'oggi ben compreso, si ipotizza che l'effetto facilitatorio sull'attività neuronale in regioni remote può essere prodotto attraverso connessioni trans-sinaptiche o attivazione diretta cortico-corticale o cortico-sottocorticale (Wu e coll., 2000). Su queste basi, abbiamo ipotizzato che la tDCS rappresenta uno strumento utile per studiare la responsività comportamentale nei pazienti con patologie neurologiche su base cronica. L'obiettivo della presente tesi di dottorato è quello di progettare, condurre e valutare studi sull'efficacia delle metodiche di neuromodulazione in soggetti affetti da disturbi neurologici ad eziologia genetica acquisita e neurodegenerativa, al fine di identificare interventi utili alla de-cronicizzazione di disordini del funzionamento cognitivo associati a patologie quali la sindrome di Rett, l'afasia e la malattia di Alzheimer. La rilevanza di una sperimentazione del genere risiede nella possibilità di trovare in futuro un'alternativa ai comuni approcci farmacologici che attualmente rappresentano il rimedio principale per il trattamento di questi disturbi che tuttavia non sono spesso risolutivi e comportano notevoli effetti collaterali e di dipendenza. Da qui, l'importanza di condurre ricerche che valutino l'efficacia di strumenti alternativi non invasivi nella finale aspettativa di identificare un trattamento elettrofisiologico efficace per i disordini neurologici così frequenti e costosi in termini sanitari e sociali.

La ricerca si articola in cinque parti principali, la riflessione nella prima parte del lavoro ha inizio con una dettagliata descrizione del concetto di neuroplasticità sia in condizioni fisiologiche che dopo un danno cerebrale seguita dalla descrizione delle tecniche di stimolazione cerebrale. Successivamente verrà presentata un'ampia panoramica in riferimento alla Sindrome di Rett si ripercorrerà la storia, si enuncerà dettagliatamente l'eziologia e i criteri che attualmente permettono di fare diagnosi. Si chiarirà il quadro complessivo dei sintomi caratterizzanti questa sindrome e si esporranno le varie forme cliniche in maniera ben definita e delineata in modo da arricchire la conoscenza circa le differenti organizzazioni neurologiche e comportamentali che la caratterizzano. Nella terza parte verrà presentata la progettazione e la realizzazione del protocollo di ricerca sperimentale nelle seguenti fasi: 1) studio pilota su singolo caso; 2) studio caso controllo su 8 bambine con sindrome di Rett divise in due gruppi (4 sperimentali sottoposti a tDCS anodica reale e potenziamento cognitivo e quattro di controllo a cui è stata somministrata la stimolazione placebo).

Nella quarta parte verrà descritta l'afasia, un disturbo della comunicazione verbale che consegue ad una lesione acquisita del cervello (Goodglass, 1994; Floel et al., 2008), seguita dalla ricerca sperimentale finalizzata a studiare gli effetti sulle funzioni linguistiche e sulla sinaptogenesi indotte dalla tDCS in un gruppo di soggetti con spiccato deficit nei meccanismi di denominazione e ripetizione. Nella quinta ed ultima parte verrà presentato uno studio caso controllo il cui scopo è stato quello di valutare gli effetti sulle performance cognitive e sulla plasticità cerebrale indotti da un trattamento prolungato di tDCS associato alla terapia farmacologica in un campione di soggetti affetti da demenza tipo Alzheimer, confrontando i risultati rispetto ad un gruppo sottoposto a stimolazione placebo e cure farmacologiche. In conclusione sarà presentata una valutazione critica dei risultati delle ricerche interfacciandola con le scoperte contemporanee e gli altri studi sulla neuroplasticità.

Parte prima

1. La plasticità cerebrale

Nell'ampio panorama di studi che si occupano del recupero delle funzioni cerebrali in seguito a lesioni o disordini neurologici, si sono sviluppate nuove linee di ricerca che hanno ampliato le nostre conoscenze in questo settore. Un importante contributo è stato fornito dall'allargamento del concetto di neuroplasticità.

Per neuroplasticità s'intende la capacità del sistema nervoso centrale (SNC) di andare incontro a modificazioni strutturali e funzionali in risposta ad eventi fisiologici (durante lo sviluppo del SNC la plasticità è massima), in risposta a stimoli ambientali (ad esempio l'apprendimento) e ad eventi patologici Spitzer et al. (2006). Nei pazienti con lesioni del SNC i fenomeni di plasticità cerebrale rappresentano i meccanismi alla base del recupero spontaneo e, se ben interpretati, possono costituire una base razionale per promuovere approcci riabilitativi mirati. La sfida delle neuroscienze sta nel capire pienamente i processi di riorganizzazione funzionale dopo una neurolesione, presupposto indispensabile al fine di prevederli e porli in relazione con la riabilitazione, con lo scopo di scoprire modi e mezzi per evocarla, migliorarla e guidarla.

Fino a poco tempo fa, gli esperti di neuroscienze erano scettici circa l'eventualità che l'esperienza potesse modificare il cervello. Gli studi di Merzenich, Kaas, Wall, Nelson, Sur, & Felleman(1983), però, hanno dimostrato per la prima volta che l'esercizio può portare a cambiamenti nella rappresentazione corticale dei distretti più attivi corrispondenti. Molti altri studi hanno avvalorato l'idea di un cervello plastico anche in età avanzata, ma è solo con i lavori di Nudo et al. (2013) che si prova che dopo un danno cerebrale è possibile indurre dei cambiamenti morfologici capaci di migliorare la performance. I risultati di questi studi suggeriscono che il training dopo una lesione può rilanciare la plasticità neurale ed il recupero funzionale. La terapia riabilitativa, infatti, evita un'ulteriore perdita della rappresentazione della struttura corporea nella corteccia intatta e induce un'espansione del territorio nella corteccia adiacente. Anche se negli anni passati diversi scienziati (Liepert, Graef, Uhde, Leidner, & Weiller, 2000) avevano palesato la possibilità di una riorganizzazione corticale dopo una lesione, il mondo scientifico ha definitivamente accettato questa tesi solo dopo la pubblicazione del lavoro di Liepert et al. (1998) che ha confermato non solo il che il cervello umano è fisiologicamente sensibile all'esperienza, ma soprattutto che questa plasticità si mantiene nei casi di lesione. L'apprendimento di nuove abilità motorie e cognitive con un SNC intatto è simile al recupero di abilità precedentemente apprese dopo un danno. Il cervello ha, dunque, la possibilità di compensare le lesioni cerebrali con meccanismi specifici e la neuroplasticità è il substrato biologico che più soddisfa le esigenze di collegamento tra recupero e premesse fisiologiche (Katz & Shatz,1996; Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000).

Tale fenomeno poggia fundamentalmente su due processi: la riorganizzazione funzionale dei circuiti neuronali e la ricostruzione strutturale dei circuiti stessi. Nel caso della riorganizzazione funzionale il recupero è da attribuire a strutture integre che assolvono funzioni normalmente non di loro pertinenza, senza che per questo esse siano costrette ad abbandonare le attività che fino a quel momento avevano normalmente svolto. Infatti, secondo il concetto di ridondanza, il nostro cervello ha molti più neuroni di quanti ne usa effettivamente, per cui se una parte va distrutta, altre ne vicariano le funzioni (Panicker, Kaas,Wadhwa, & Roy, 2002).

Il riarrangiamento strutturale consiste, invece, in quei processi di ricostituzione anatomica dei circuiti stessi nei punti in cui essi erano stati interrotti dalla causa lesiva. Tali meccanismi si identificano in una serie di processi essenzialmente a carico delle cellule nervose integre situate in aree topograficamente adiacenti all'area cerebrale lesa (Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000). La rigenerazione vera e propria degli assoni lesi è stata osservata solo sporadicamente, mentre un ruolo fondamentale è da attribuire alla neoformazione di connessioni sinaptiche (sinaptogenesi) per effetto di uno sprouting assonale terminale o collaterale, che tende ad occupare i siti rimasti vacanti. Con lo sprouting i neuroni perilesionali sopravvissuti all'ictus iniziano ad emettere dei germogli il cui esito è una crescita di fibre nervose che raggiungono nuove terminazioni cellulari, comportando così un'espansione territoriale di innervazione dal neurone di origine (Fiala, Feinberg, Popov, & Harris, 1998; Alladi, Roy, Singh, & Wadhwa, 2005).

1.1 Natura (geni), ambiente (adattamento) e periodo critico.

Un quesito teorico altamente dibattuto e argomentato in merito ai meccanismi sottostanti la complessa organizzazione dei circuiti cerebrali è se la costruzione dei circuiti nervosi dipende esclusivamente dall'esecuzione di un programma genetico, o è influenzata dall'interazione fra l'individuo e l'ambiente.

Sappiamo da tempo, che il nostro sistema nervoso è costituito da reti neuronali specializzate nel controllo di diverse funzioni indispensabili per la sopravvivenza, quali la rappresentazione sensoriale del mondo esterno, la produzione e il controllo dei comportamenti e la regolazione delle attività vegetative. Per garantire una corretta prestazione del sistema è necessario che le cellule nervose che compongono ogni circuito siano connesse fra di loro in maniera altamente specifica, fino a costituire specifiche mappe neurali che riproducono fedelmente le superfici sensoriali o le sequenze dei comandi motori (Wang, Conner, Rickert, & Tuszynski, 2011).

È indiscutibile che le informazioni contenute nel patrimonio genetico e perfezionate nel corso dell'evoluzione svolgano un ruolo determinante. Tuttavia, è logico affermare che i circuiti nervosi costruiti esclusivamente sulla base di istruzioni interne potrebbero funzionare in maniera adeguata solo di fronte a condizioni ambientali immutabili, nelle quali ogni singolo oggetto o comportamento fosse sempre codificato da caratteristiche univoche e costanti. Sappiamo la vita nel nostro ambiente non è così organizzata. Al contrario, la ragione principale del successo della vita sulla terra sta proprio nella capacità degli organismi di adattarsi alla mutevolezza delle condizioni ambientali. Di conseguenza, qualsiasi processo di sviluppo è sempre il risultato dell'interazione fra fattori genetici e segnali ambientali. Uno dei primi autori a definire chiaramente il concetto, secondo il quale le capacità di apprendimento sono più spiccate negli individui giovani e, addirittura, che alcune funzioni non possono più essere acquisite dopo una certa età è stato Sigmund Freud (1935). Freud mise in evidenza come determinati eventi accaduti durante l'infanzia condizionino in maniera pressochè definitiva la personalità dell'individuo. Le conclusioni di Freud, raggiunte attraverso un'analisi retrospettiva che parte dagli effetti per risalire alle cause, sono state confermate in diversi modelli sperimentali, nei quali l'interazione fra individuo ed ambiente viene alterata in maniera controllata come ad esempio, negli studi condotti da Dodsworth & Harlow (1965) sullo sviluppo

del comportamento sociale delle scimmie. Questi autori notarono che i cuccioli di scimmia allevati in totale isolamento durante i primi mesi di vita, una volta reintrodotti nella colonia risultavano del tutto incapaci di intrattenere normali interazioni sociali, come stabilire rapporti di gerarchia o prendersi cura dei piccoli. Le anomalie del comportamento non miglioravano neppure dopo una lunga permanenza nella colonia, indicando come l'esperienza maturata nel corso dei primi mesi di vita avesse lasciato postumi non più modificabili dalle vicende successive. Per contro, scimmie adulte poste in isolamento per lunghi periodi non sviluppavano nessuna alterazione comportamentale. È chiaro quindi che le regole del comportamento sociale delle scimmie possono essere acquisite solo durante un preciso periodo dello sviluppo, che definiremo "critico", trascorso il quale non possono più essere né apprese né dimenticate.

Esiste perciò una predisposizione del sistema nervoso verso stimoli con caratteristiche specifiche, la cui somministrazione durante il periodo critico induce una rapida e definitiva acquisizione del comportamento (Nicholls, Martin, & Wallace, 1992; Ronan, Wu, & Crabtree, 2013).

Prendendo in esame il sistema visivo, possiamo facilmente dimostrare che questa conclusione è corretta. Nei soggetti affetti da cataratta la visione è impedita dall'opacizzazione del cristallino, ma la componente nervosa dell'apparato visivo non è alterata. Questo disturbo colpisce numerose persone anziane, che vengono trattate chirurgicamente e riacquistano una funzione visiva praticamente normale (Shatz, 1997).

Esistono però casi di cataratta congenita. In questi individui se il cristallino opacizzato viene rimosso dopo una certa età rimangono difetti visivi permanenti: la capacità di vedere e discriminare gli oggetti è molto ridotta e non migliora neanche dopo un'intensa attività di rieducazione. Anche la funzione visiva deve quindi essere sviluppata nel corso dei primi anni di vita attraverso un processo di apprendimento per il quale l'esperienza sensoriale è determinante.

L'apparato visivo è relativamente semplice e molto meglio conosciuto rispetto ai sistemi che regolano le funzioni complesse, che abbiamo descritto prima. Queste condizioni permettono di trasferire il livello di indagine dall'analisi comportamentale allo studio dei meccanismi cellulari e molecolari che intervengono durante i processi di apprendimento. È così possibile determinare come la struttura e la funzione dei circuiti nervosi siano plasmate dall'esperienza.

1.2 Esperienza e cambiamento della plasticità del sistema nervoso centrale.

Il sistema nervoso centrale per costruire una rappresentazione unitaria dell'ambiente esterno deve, elaborare e fondere le informazioni sensoriali derivanti dalle strutture visive periferiche. Il substrato anatomico-strutturale di tale fusione è dato dalla convergenza delle afferenze provenienti da regioni omologhe delle due retine su singoli neuroni della corteccia occipitale visiva (Ackman, Burbridge, & Crair, 2012).

Infatti, nelle stazioni sottocorticali le afferenze derivate da ciascun occhio terminano segregate su neuroni diversi. Negli individui adulti gli assoni genicolo-corticali si distribuiscono nel quarto strato della corteccia visiva primaria definendo una serie di moduli alternati e distinti ognuno dei quali riceve informazioni provenienti da una sola retina. Tuttavia, tale convergenza non è perfettamente bilanciata e la maggioranza dei

neuroni binoculari risponde preferenzialmente agli stimoli portati ad uno dei due organi sensoriali (Nicholls, Martin, & Wallace, 1992; Ackman, Burbridge, & Crair, 2012).

Si definisce così un sistema anatomico-funzionale di colonne di dominanza oculare, orientate secondo l'asse perpendicolare alla superficie corticale, ognuna delle quali è costituita da un modulo monoculare del quarto strato e dai neuroni "binoculari" degli strati adiacenti, la cui attività è dominata dal medesimo occhio.

Se si registrano in maniera sistematica le risposte evocate dagli stimoli visivi nei neuroni corticali si troverà quindi una popolazione eterogenea di cellule monoculari e binoculari, caratterizzate da diversi gradi di dominanza. Convenzionalmente, si raggruppano queste cellule in sette categorie, delle quali la prima e la settima contengono i neuroni monoculari, la quarta i neuroni egualmente attivati da entrambi gli occhi, mentre le categorie intermedie, 2-3 e 5-6, rappresentano i neuroni binoculari dominati rispettivamente dall'occhio contralaterale o ipsilaterale.

L'analisi della dominanza oculare in animali neonati ancora privi di esperienza visiva, mostra una distribuzione apparentemente normale, sebbene l'attività evocata sia meno attiva che nell'adulto e vi siano molte cellule che non rispondono agli stimoli visivi. La struttura basilare delle connessioni necessarie per la visione binoculare sembra quindi essere già presente alla nascita, prima che il sistema visivo venga esposto all'esperienza sensoriale (Johnson & Kerschensteiner, 2014).

Nonostante ciò, l'organizzazione corticale si presenta notevolmente immatura, infatti, gli assoni genicolocorticali non formano le tipiche bande alterne, ma si distribuiscono in maniera uniforme lungo tutto il quarto strato (Spitzer, 2006). La trama dei moduli monoculari emerge gradatamente nelle settimane successive attraverso un profondo rimodellamento plastico degli assoni talamo-corticali, caratterizzato da una contemporanea retrazione e proliferazione di ramificazioni neuritiche e contatti sinaptici. In altri termini, sebbene l'infrastruttura corticale essenziale sia già presente alla nascita, la sua organizzazione definitiva matura nel corso delle prime settimane di vita, proprio quando il sistema visivo viene per la prima volta esposto agli stimoli luminosi. Dunque, alcuni autori si sono posti il quesito teorico ed empirico rispetto al ruolo svolto dall'esperienza sensoriale nella costruzione dei circuiti corticali visivi. Wiesel e Hubel (1981) che avevano scoperto l'organizzazione colonnare della corteccia visiva, studiarono gli effetti della deprivazione sensoriale sullo sviluppo del sistema visivo, suturando le palpebre di un occhio a scimmie o gatti neonati durante il periodo in cui si formano le colonne di dominanza oculare. La procedura non toccava in alcun modo le strutture nervose dell'apparato visivo e, infatti, non vi erano segni di degenerazione nervosa e diversi parametri funzionali erano normali. Tuttavia, quando la sutura veniva rimossa gli animali risultavano praticamente ciechi dall'occhio deprivato e l'organizzazione corticale appariva profondamente alterata. La grande maggioranza dei neuroni rispondeva esclusivamente a stimoli portati all'organo sensoriale non-deprivato e solo in pochissime cellule si poteva evocare una risposta stimolando l'occhio che aveva avuto le palpebre serrate. Gli studi anatomici dimostravano che le fibre talamo-corticali attivate dall'occhio intatto avevano espanso il loro territorio terminale a spese di quelle contro laterali, i cui neuroni di origine nel corpo genicolato laterale presentavano corpi cellulari di dimensioni ridotte e dendriti atrofici.

Queste alterazioni erano dovute alla perdita di una esperienza visiva strutturata più che alla semplice mancanza di stimolazione luminosa. A riprova del fatto che i difetti anatomico-funzionali erano dovuti alla mancanza di esperienza sensoriale in quel preciso periodo dello sviluppo, la medesima deprivazione monoculare praticata su animali adulti non produceva nessuna alterazione evidente e, una volta rimossa la sutura, la visione attraverso l'occhio deprivato risultava del tutto normale.

1.3 Ruolo dei fattori di accrescimento neuronali (neurotrofine) nei processi di neuroplasticità

La maturazione della citoarchitettura corticale richiede l'interazione tra precisi patterns di attività dei sistemi afferenti e di meccanismi post-sinaptici. Questi ultimi comprendono da un lato il riconoscimento dell'attività presinaptica specifica, dall'altro la produzione di segnali capaci di indurre la plasticità degli assoni afferenti selezionati. Le neurotrofine, il cui capostipite è il fattore di accrescimento nervoso (NGF) scoperto da Rita Levi Montalcini (2012), costituiscono una famiglia di molecole rilasciate dalle cellule bersaglio per regolare la sopravvivenza, il fenotipo e la crescita assonale dei neuroni afferenti. Recentemente, è stato osservato che le neurotrofine sono presenti in diverse aree cerebrali dotate di spiccate capacità plastiche e che possono influenzare i fenomeni di plasticità sinaptica. Ciò ha suggerito che queste sostanze potrebbero partecipare ai processi di rimodellamento nello sviluppo del sistema visivo.

Allo stesso modo, sarebbero presenti nella corteccia visiva limitate quantità di neurotrofina, che verrebbe captata dagli assoni afferenti in base al loro livello di attività elettrica. Così, le fibre maggiormente attive risulterebbero selettivamente stimulate a crescere a scapito delle altre. L'infusione di NGF renderebbe i livelli di neurotrofina disponibili tali da permettere anche la crescita delle afferenze ipoattive derivate dall'occhio deprivato. Per contro, l'applicazione dell'anticorpo bloccante eliminerebbe il segnale retrogrado necessario per indurre la crescita assonale, rallentando notevolmente la progressione dei fenomeni plastici.

Benchè questi esperimenti dimostrino chiaramente l'importanza dell'NGF nei fenomeni di plasticità della corteccia visiva, è stato messo in dubbio che questa molecola agisca direttamente sulle connessioni genicolocorticali, poiché il recettore per l'NGF TrkA non è espresso dai neuroni del corpo genicolato laterale. Tuttavia, è stato osservato che sia neuroni genicolo-corticali che diverse cellule della corteccia visiva esprimono il recettore TrkB, che riconosce altre neurotrofine quali BDNF e NT4. Sulla base di queste osservazioni, Carla Shatz ha infuso diverse neurotrofine nella corteccia visiva di gattini durante il periodo critico: in questi animali l'applicazione di BDNF o NT4, ma non quella di NGF o NT3, impedisce la segregazione degli assoni genicolo-corticali e la formazione dei moduli del quarto strato della corteccia visiva. Inoltre, l'infusione di NT4, ma non delle altre neurotrofine, previene l'atrofia dei neuroni del corpo genicolato laterale indotta dalla deprivazione monoculare. Le neurotrofine svolgono un ruolo cruciale per la progressione dei fenomeni di competizione dipendente dall'attività necessari per sviluppare l'organizzazione colonnare. Nella competizione sarebbero avvantaggiati gli assoni dotati di attività più vivace, sia perchè più efficaci nell'indurre il rilascio di neurotrofine dai neuroni postsinaptici, sia perchè più pronti a captare le sostanze liberate. In questo modo il livello di attività afferente regolerebbe la quantità locale di fattore trofico disponibile, il quale a sua volta finirebbe per selezionare e rinforzare le afferenze maggiormente attive.

Nonostante l'attrattiva semplicità di questo modello, è stato messo in dubbio che il meccanismo d'azione delle neurotrofine sia sufficientemente rapido per rilevare la coincidenza temporale di attività fra i neuroni corticali e le loro afferenze. È stato quindi proposto che, piuttosto che svolgere un ruolo istruttivo quale segnale retrogrado diretto a selezionare le connessioni più efficaci, esse svolgano un ruolo permissivo, modificando la soglia dei processi di plasticità in modo da rendere più pronte al potenziamento determinate sinapsi più disponibili alla depressione di altre (Birkenmeier, Prager, & Lang, 2010; Capaday, Ethier, Vreeswijk, & Darling, 2013).

1.4 Neuroplasticità e sviluppo

Il programma genetico che sovrintende allo sviluppo del sistema nervoso crea un'infrastruttura di base necessaria per riconoscere e selezionare gli stimoli rilevanti e per predisporre i meccanismi cellulari e molecolari che regolano le modificazioni plastiche. Una volta raggiunte queste condizioni il sistema è pronto ad interagire con l'ambiente esterno ed inizia il periodo critico. In questo intervallo di tempo l'esperienza agisce modificando attivamente la struttura e la funzione dei circuiti nervosi in modo da renderli capaci di rappresentare il mondo esterno in maniera congruente o di produrre comportamenti adattativi. Generalmente, questo periodo si chiude quando è stata maturata un'esperienza sufficiente ad indurre le necessarie modificazioni plastiche e, perciò, si prolunga se l'esperienza viene a mancare. La sua durata è comunque limitata e, in ogni caso ad un certo punto le connessioni formate vengono stabilizzate e le potenzialità plastiche fortemente ridotte. Ogni ulteriore esperienza, per intensa o duratura che sia, non può più modificare sostanzialmente l'assetto raggiunto al termine del periodo critico. Si è osservato che si esauriscono i meccanismi necessari per i processi di plasticità sinaptica. Ad esempio, al termine del periodo critico nel quarto strato della corteccia visiva si riduce l'espressione di recettori glutammatergici di tipo NMDA, che sono importanti per i fenomeni di potenziamento a lungo termine. Di conseguenza, tali fenomeni possono essere indotti con maggiore difficoltà (Fox, Henley, Isaac, 1999).

Inoltre, diminuiscono le capacità di crescita dei processi nervosi e si riduce la sensibilità dei neuroni per le neurotrofine. La fine del periodo critico corrisponde con la riduzione di proteine associate alla crescita assonale, come GAP-43, la cui espressione persiste esclusivamente in aree cerebrali dotate di funzioni plastiche anche nell'adulto, quali l'ippocampo e la corteccia cerebellare. Al tempo stesso, l'ambiente del sistema nervoso centrale diviene meno permissivo, o inibitorio, per l'allungamento neuritico (Lichtman, Burden, Culican, & Wong, 1999; Chen, Ozturk, & Zhou, 2013).

La fine del periodo critico coincide infatti con la mielinizzazione e la comparsa di proteine inibitrici della crescita assonale presenti nella mielina centrale (Knudsen, 1999). Infine, si riducono i meccanismi che mantengono elevati l'attenzione e lo stato di attivazione nelle aree corticali. La fine del periodo critico coincide con la riduzione di neurotrasmettitori, come la noradrenalina o l'acetilcolina, che regolano i livelli di attività corticale (Nicholls, Martin, & Wallace, 1992).

Tutte queste osservazioni indicano che le condizioni necessarie perchè i processi plastici possano avere luogo sono presenti solo durante una precisa finestra temporale, al termine della quale vengono attivamente

sopresse dagli elementi stessi del sistema (Sharma, Nag, Wadhwa, & Roy, 2009). In altre parole, il ritmo imposto dai programmi genetici di sviluppo fissa sia l'inizio che la fine del periodo critico. Esiste però anche un'interpretazione alternativa. In effetti, se i fenomeni di plasticità possono essere ricondotti ad una serie di processi di competizione, allora potrebbero aver termine quando i circuiti nervosi raggiungono un assetto tale da impedire qualsiasi ulteriore interazione competitiva. Per esempio, una volta che l'esperienza ha indotto la segregazione delle afferenze genicolo-corticali nei rispettivi moduli, non vi è più possibilità di competizione fra gli assoni afferenti semplicemente perchè si trovano separati su aree bersaglio distinte. La fine del periodo critico potrebbe quindi essere dovuta non solo alla perdita delle capacità plastiche intrinseche al sistema nervoso, ma anche al fatto che i circuiti neurali hanno raggiunto una configurazione di connessioni stabili, distribuite su territori bersaglio privati, che impedisce di fatto ogni ulteriore interazione fra gli elementi nervosi. Questa ipotesi spiegherebbe, tra l'altro, il prolungarsi del periodo critico quando viene a mancare l'esperienza (Watt, Cuntz, Mori, Nusser, Sjöström, & Häusser, 2009).

La comprensione di questi meccanismi non è solo importante per approfondire la nostra conoscenza di base sulla neurobiologia dello sviluppo, ma anche per poter intervenire sul sistema nervoso al fine di ottenere un recupero efficace in caso di esperienze inadeguate, come nei portatori di cataratta congenita, o in seguito ad una lesione. In questo ambito, sarebbe davvero importante poter riaprire un periodo critico, ristabilendo le condizioni adatte affinché una corretta esperienza, o un intervento terapeutico simile, possano ripristinare le connessioni anatomiche e le relative interazioni funzionali necessarie per la normale prestazione del sistema nervoso.

1.5 Neuroplasticità esperienza dipendente dal sistema nervoso.

Al termine dello sviluppo e della maturazione del sistema nervoso, le capacità plastiche non vengono spente del tutto. Infatti anche un individuo adulto è in grado di apprendere nuovi comportamenti, di memorizzare nuovi episodi della propria vita. Le modificazioni del sistema nervoso centrale consistono in variazioni dell'efficacia della trasmissione sinaptica (Allred, Maldonado, Hsu, & Jones, 2005).

La facilitazione sinaptica è un aumento transitorio di efficacia sinaptica che avviene quando due o più potenziali d'azione raggiungono il terminale sinaptico di un assone in stretta successione, determinando un aumento progressivo della quantità di neurotrasmettitore rilasciato da ogni potenziale d'azione. Di conseguenza le variazioni di voltaggio che il neurotrasmettitore genera nella cellula post-sinaptica (potenziali post-sinaptici) diventano progressivamente più grandi (Aroniadou-Anderjaska & Keller, 1993; Biernaskie, Szymanska, Windle, & Corbett, 2005). Per comprendere il meccanismo della facilitazione sinaptica bisogna considerare che il segnale che provoca il rilascio di neurotrasmettitore è un aumento di ioni calcio (Ca^{2+}) all'interno del terminale sinaptico. Tale aumento di Ca^{2+} è generato dall'arrivo del potenziale d'azione che, avviene in meno di un millisecondo. Invece, la ridiscesa del Ca^{2+} ai livelli di riposo è più lenta, ed è possibile che un secondo potenziale d'azione raggiunga il terminale prima che il Ca^{2+} sia tornato ai livelli iniziali. Allora il secondo aumento di Ca^{2+} parte da un livello più alto, e raggiunge una concentrazione maggiore nel terminale. La conseguenza è che la più elevata concentrazione di Ca^{2+} causa il rilascio di una

maggior quantità di neurotrasmettitore. La facilitazione sinaptica dura solo qualche frazione di secondo, e quindi è una forma di plasticità di durata molto breve (Ramachandran, 1993; Butefisch, Kleiser, & Seitz, 2006). In alcuni tipi di sinapsi un'attivazione ripetitiva provoca invece l'effetto opposto: la *depressione a breve termine*. Questa è spiegata dal fatto che in tali sinapsi un singolo potenziale d'azione fa rilasciare così tante vescicole contenenti il neurotrasmettitore che l'arrivo di un secondo potenziale d'azione trova meno vescicole pronte per il rilascio. La depressione a breve termine può durare alcuni secondi, finché le vescicole che si sono svuotate non vengono sostituite da altre ed avviate ad essere nuovamente riempite e riutilizzate. Una rapida successione di molti potenziali d'azione, detta tetano, provoca un terzo tipo di plasticità sinaptica a breve termine, detto *potenziamento post-tetanico*. Questo è spiegato da un aumento talmente elevato di Ca^{2+} nel terminale sinaptico, che i sistemi di tamponamento e di estrusione di questo ione vengono eccessivamente sovraccaricati e il Ca^{2+} rimane elevato molto più a lungo del normale. Questa prolungata elevazione di Ca^{2+} attiva dei processi che rendono un maggior numero di vescicole disponibili per il rilascio di neurotrasmettitore. In queste condizioni l'arrivo di un potenziale d'azione nel terminale sinaptico provoca il rilascio di una quantità di neurotrasmettitore maggiore del normale. Il potenziamento post tetanico persiste per alcuni minuti. Purtroppo, se da un lato si ritiene che questi meccanismi di plasticità sinaptica a breve termine possano essere implicati nella memoria a breve termine, d'altro lato non ci sono attualmente ipotesi sufficientemente accreditate che spieghino le relazioni tra di esse (Zucker, 1989; Wilson & Tonegawa, 1997).

1.6 Meccanismi della plasticità neurale a lungo termine

I fenomeni di apprendimento e consolidamento delle tracce mnestiche di lunga durata richiedono delle modificazioni sinaptiche stabili. Tali modificazioni sono state scoperte in molte aree del SNC, ed in alcuni casi è stato possibile comprendere il nesso esistente tra il fenomeno della plasticità sinaptica e quello cognitivo comportamentale (Malenka & Nicoll, 1999).

A questo proposito uno dei sistemi neurali più studiato riguarda le sinapsi ippocampali (Kim, Chang, Lee, Lee, Shin, et al. 2006). Agli inizi degli anni 70 alcuni ricercatori scoprirono che una breve stimolazione tetanica di un fascio di assoni nell'ippocampo provocava un potenziamento della trasmissione sinaptica che persisteva per settimane. Chiamarono questo fenomeno "long term potentiation" (LTP) (Brown, Boyd, & Murphy, 2010).

La maggioranza degli esperimenti sono stati fatti sul LPT delle sinapsi che collegano i neuroni piramidali di due regioni dell'ippocampo chiamate CA3 e CA1. Tale connessione costituisce un'importante tappa della via che percorrono le informazioni che attraversano l'ippocampo subendo delle elaborazioni non ancora del tutto chiarite. Le fibre che partono da CA3, dette collaterali di Schäffer, si pongono in contatto sinaptico in CA1, e più precisamente con i dendriti delle cellule piramidali di quest'area. Il particolare interesse a CA1 è legato al fatto che una lesione di quest'area provoca un grave deficit delle capacità di memorizzazione. Inoltre CA1 è una regione in cui il LPT è particolarmente intenso e riproducibile. La stimolazione delle collaterali di Schäffer evoca un potenziale post-sinaptico eccitatorio (PPSE). Se si stimola un fascio di collaterali di

Schäffer con un singolo impulso ogni 20-30 secondi la risposta post-sinaptica in CA1 rimane immutata. Se invece si somministra un treno di stimoli ad alta frequenza (tetano: 50 o 100 impulsi alla frequenza di 100 Hz) si ottiene un duraturo aumento dell'ampiezza del PPSE evocato, ovvero LPT. Quindi questa sinapsi si potenzia quando viene attivata in modo intenso e ripetitivo. Tale tipo di tetano è per la cellula una stimolazione molto intensa, e non ci sono prove conclusive sull'esistenza nell'individuo intatto di scariche di potenziali d'azione sincroni in un fascio di fibre che abbiano le caratteristiche sufficienti per essere equivalenti ai tetani evocati sperimentalmente. Si è allora cercato di trovare dei protocolli di stimolazione che meglio riproducessero i segnali che normalmente i neuroni di CA3 inviano a CA1 (Butefisch, Kleiser, & Seitz, 2006). Due protocolli particolarmente efficaci che allo stesso tempo sono simili alla scarica sincrona dei neuroni ippocampali durante l'apprendimento sono la "theta-burst stimulation" e la "primed-burst stimulation". La "theta-burst stimulation" consiste in più treni composti ciascuno da 4 impulsi alla frequenza di 100 Hz ripetuti ogni 200 ms. La "primed-burst stimulation" è composta da un singolo impulso seguito a 200 ms di distanza da un solo treno di 4 impulsi alla frequenza di 100Hz. L'efficacia di questi due protocolli che riproducono i segnali che arrivano fisiologicamente alla sinapsi studiata dimostra che il LPT non è un semplice fenomeno di laboratorio, ma che può avvenire anche in vivo durante la memorizzazione di nuovi eventi. Le tre proprietà basilari del LPT che lo rendono un ottimo modello per la base cellulare della memoria sono la cooperatività, l'associatività e la specificità dell'afferenza (Bliss & Collingridge, 1993).

La **cooperatività** consiste nella necessità di attivare non una singola fibra presinaptica, ma un numero sufficientemente grande di fibre che "cooperano" nell'indurre nel neurone postsinaptico il LPT.

Tra l'effetto di una singola fibra e quello del numero sufficiente per indurre LTP esistono degli stati in cui l'attivazione di un numero intermedio di fibre evoca solo un potenziamento post-tetanic, della durata di pochi minuti, o un "potenziamento a breve termine" (PBT) della durata di 5-20 minuti. Esistono quindi delle "soglie" di cooperatività che, in ordine crescente, inducono potenziamento post-tetanic, PBT o LTP. La **associatività** consiste nella possibilità di indurre LTP in un'afferenza con uno stimolo "debole", al di sotto della "soglia" per il LTP, se questo viene associato ad uno stimolo "forte" somministrato ad un'altra afferenza che converga sulla stessa cellula. Infine il LTP è **afferenza-specifico** perché le fibre che non sono attive durante il tetano non condividono il potenziamento indotto nella afferenza tetanizzata (Malenka & Bear, 2004). Queste tre proprietà sono spiegabili con un'unica teoria, che in realtà fu enunciata già mezzo secolo fa dallo psicologo Donald Hebb (1949), molti anni prima della scoperta della plasticità sinaptica a lungo termine. Tale teoria predice, come regola di apprendimento neuronale, che una sinapsi si debba potenziare solo nel caso in cui venga attivata mentre la membrana postsinaptica è depolarizzata. In altre parole, per indurre la modificazione plastica di una sinapsi è necessaria la coincidenza temporale di due eventi: un'attivazione della sinapsi e una depolarizzazione dello stesso neurone post-sinaptico nella regione cellulare in cui si trova il contatto sinaptico in questione.

La necessità di attivare un sufficiente numero di fibre (cooperatività) o di attivare un'afferenza sufficientemente potente (associatività) è spiegata dal secondo termine della coincidenza: la depolarizzazione del dendrite in cui si trova la sinapsi da potenziare. La specificità dell'afferenza è spiegata dal primo termine

della coincidenza: la necessità che la sinapsi da modificare sia attiva. Alle altre sinapsi della stessa cellula non attive durante la depolarizzazione, in cui la membrana post sinaptica viene depolarizzata, mancherebbe questo elemento. Questa regola di induzione della plasticità sinaptica è stata confermata da esperimenti in cui la depolarizzazione post-sinaptica veniva evocata direttamente, iniettando corrente depolarizzante con un elettrodo intracellulare. L'appaiamento di tale depolarizzazione con l'attivazione a bassa intensità e bassa frequenza di un'afferenza induceva LTP.

La “regola di apprendimento” che induce plasticità sinaptica in CA1 è dunque la coincidenza di due eventi cellulari. Deve quindi esistere in queste cellule un sistema molecolare che funzioni come rilevatore di coincidenza. In CA1 tale rilevatore di coincidenza è stato identificato in un recettore ionotropo del glutammato noto come recettore NMDA. Tale recettore è un canale di membrana che viene fatto aprire dal legame del neurotrasmettitore glutammato, ma al potenziale di riposo della cellula tale apertura non ha nessun effetto perché il canale resta bloccato dagli ioni magnesio (Mg^{2+}) presenti nel liquido extracellulare. Quindi il canale in questa situazione è aperto ma la corrente non fluisce a causa della presenza del Mg^{2+} . Una depolarizzazione della membrana in cui si trova il recettore ha l'effetto di espellere, per repulsione di cariche elettriche dello stesso segno, il Mg^{2+} che teneva bloccato il canale. La depolarizzazione da sola perciò sblocca il canale che tuttavia rimane chiuso. Quindi il canale-recettore NMDA può condurre una corrente di ioni solo se si verifica la coincidenza di due eventi: il legame del glutammato e la depolarizzazione della membrana. Il fatto di essere allo stesso tempo un recettore del glutammato e un canale bloccato in modo voltaggio-dipendente dal Mg^{2+} rendono il recettore NMDA un rilevatore di coincidenza molecolare. Inoltre, l'andamento insolitamente lento della corrente NMDA insieme alla sua voltaggio-dipendenza rendono le risposte mediate da questo recettore particolarmente soggette agli effetti delle sinapsi inibitorie. Questa sensibilità all'inibizione, insieme alla depressione a breve termine delle sinapsi inibitorie, rende ragione della necessità di treni di impulsi di stimolazione ad alta frequenza per vincere l'inibizione ed aumentare progressivamente la corrente NMDA (Autry, Adachi, Nosyreva, Na, Los, Cheng, et al. 2011).

Il ruolo centrale del recettore NMDA nell'induzione del LTP è dimostrato dal fatto che in tutti gli esperimenti in cui si è bloccato tale recettore con molecole agenti con diversi meccanismi e su diverse parti della molecola veniva abolito il LTP. Tuttavia l'applicazione di un agonista selettivo per i recettori NMDA non è sufficiente per indurre LTP anche se permette di indurre facilmente potenziamento a breve termine. Anzi un'attivazione dei recettori NMDA con un agonista, oltre non indurre LTP, preclude un successivo LTP evocato con uno stimolo altrimenti adeguato.

Fin qui abbiamo visto come il recettore NMDA sia necessario per il LTP e come funzioni da rilevatore di coincidenza molecolare. Il passaggio successivo è vedere cosa lega la corrente che fluisce in queste condizioni attraverso il canale-recettore NMDA e l'induzione del LTP. La risposta si trova nei tipi di ioni a cui questo canale è permeabile. Infatti, mentre la maggioranza dei recettori-canali che mediano messaggi eccitatori è permeabile solo agli ioni sodio e potassio, il canale-recettore NMDA ha la particolarità di essere permeabile anche agli ioni Ca^{2+} . Questo fa sì che ogni volta che si verifica la coincidenza che permette un flusso di ioni attraverso il canale, gli ioni Ca^{2+} si riversano nel dendrite della cellula postsinaptica entrando

esattamente a livello dell'area del contatto sinaptico attivato. A questo Ca^{2+} se ne aggiunge altro che entra da canali operati dal voltaggio che vengono fatti aprire dalla depolarizzazione sinaptica, che ha la massima ampiezza nell'area del contatto sinaptico e si propaga alle altre regioni del neurone con decremento. L'aumento di Ca^{2+} nel dendrite viene ulteriormente amplificato dal rilascio dai depositi intracellulari. Anche tale rilascio contribuisce all'induzione del LTP perché i bloccanti dei canali che permettono la fuori uscita di Ca^{2+} dai depositi impediscono il LTP. In quest'ultimo meccanismo è implicato un recettore metabotropo del glutammato, che tramite una via di trasduzione del segnale che inizia dall'attivazione di una proteina-G porta all'apertura dei canali presenti nelle membrane dei depositi intracellulari di Ca^{2+} , provocandone la fuoriuscita nel citoplasma.

Recenti conferme del ruolo del recettore NMDA nel LTP e la connessione tra questi eventi cellulari e la memoria per i luoghi (memoria spaziale) vengono da esperimenti su topi in cui con tecnologie di biologia molecolare sono stati distrutti o modificati i geni che codificano per il recettore NMDA (Autry, Adachi, Nosyreva, Na, Los, Cheng, et al. 2011). In uno di questi è stato eliminato esclusivamente nelle cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo un gene indispensabile per la funzionalità di tutti i recettori NMDA. In questi topi naturalmente manca del tutto il LTP della sinapsi tra collaterali di Schäffer e cellule piramidali di CA1 nonostante un perfetto funzionamento della sinapsi per i segnali che normalmente non inducono plasticità. Tuttavia il dato più interessante è che a questi topi manca anche la capacità di memorizzare e ricordare la posizione di un oggetto. Si considera che questo tipo di deficit derivi dall'incapacità di formare una mappa spaziale del luogo che permetta poi di memorizzare le coordinate della posizione dell'oggetto. Nell'ippocampo normale ci sono cellule che si attivano in corrispondenza di un determinato luogo; nei topi mutanti a cui mancano i recettori NMDA di CA1 queste cellule hanno perso la capacità di attivarsi in modo specifico per un determinato punto dello spazio in cui si trova il topo. L'insieme di queste alterazioni presenti nei topi a cui mancano i recettori NMDA in CA1 conferma la connessione tra il fenomeno cellulare del LTP, l'apprendimento delle cellule che devono mappare un luogo e la memorizzazione della posizione degli oggetti (Autry, Adachi, Nosyreva, Na, Los, Cheng, et al. 2011). Se eliminando i recettori NMDA dell'ippocampo si è ottenuta l'abolizione del LTP e dell'apprendimento spaziale, si può pensare che la migliore conferma del coinvolgimento di questo meccanismo possa essere l'esperimento opposto: aumentando la funzionalità dei recettori NMDA ci aspettiamo un maggiore LTP e migliori capacità mnemoniche. Questo esperimento sembrerebbe impossibile perché si ritiene che l'evoluzione abbia portato ad una ottimizzazione delle prestazioni fisiche e intellettive delle specie sopravvissute. Tuttavia, è noto che nel corso della vita di un individuo le capacità di apprendimento non rimangono costanti: i periodi in cui le capacità di imparare sono maggiori sono l'infanzia e la giovinezza per poi decrescere passando all'età adulta. Uno dei geni che codificano per i componenti del recettore NMDA, detto NR2B, viene intensamente espresso fino alla giovinezza per poi spegnersi quasi completamente passando all'età adulta. Senza il componente NR2B il recettore può ancora funzionare, ma la presenza di NR2B aumenta la quantità di ioni che entrano attraverso il canale-recettore NMDA perché prolunga la durata della corrente di ioni. Recentemente (Chikahisa, Sei, Morishima, Sano, Kitaoka, Nakaya,

et al., 2006) è stato prodotto un topo in cui NR2B continua ad essere espresso abbondantemente anche in età adulta nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo. Questo topo ha un LTP che anche nell'adulto viene indotto con estrema facilità come nel topo più giovane, confermando il rapporto di causa-effetto tra il recettore NMDA e il LTP. Però il risultato più importante di questo studio è che il topo che continua ad esprimere NR2B, in età adulta ha delle capacità di apprendimento e di memorizzazione superiori rispetto ai suoi coetanei normali. Questo risultato è importante perché può essere visto come una modificazione genetica che ha aumentato le prestazioni intellettuali. Inoltre questa è un'ulteriore dimostrazione dello strettissimo rapporto esistente fra recettore NMDA, LTP e memoria (Kim, Lee, Chang, Lee, Lee, Shin, et al., 2006).

Tutti i meccanismi descritti fino ad ora spiegano l'induzione del LTP e la sua espressione per un tempo che va fino a un'ora circa. Dalla seconda ora in poi possono entrare in gioco altri meccanismi, che sono ancora meno conosciuti dei precedenti. Per esempio, alcuni studi sembrano indicare che a un certo punto anche la fibra presinaptica modifichi il proprio livello di funzionamento, rilasciando una maggiore quantità di glutammato (LoTurco, Owens, Heath, Davis & Kriegstein, 1995). Questo effetto sulla fibra presinaptica dipende però dall'induzione del LTP descritto sopra che avviene nel dendrite della cellula postsinaptica. Deve quindi esistere un messaggero retrogrado che, dalla cellula post sinaptica, torni indietro alla fibra presinaptica e potenzi i sistemi che controllano il rilascio di neurotrasmettitore. Alcune molecole che si ritiene che potrebbero essere il messaggero retrogrado del LTP sono il monossido di azoto (NO), il monossido di carbonio, l'acido arachidonico, il fattore attivante le piastrine (PAF). Si tratta di molecole che diffondono facilmente da una cellula all'altra perché possono attraversare liberamente le membrane cellulari. Tuttavia non tutti gli studiosi concordano sulla partecipazione di queste molecole al LTP, e la questione del messaggero retrogrado è tuttora aperta.

Alcuni laboratori hanno dimostrato che in una fase tardiva del LTP si hanno delle modificazioni nella trascrizione dei geni da parte della cellula. Molti di questi geni potrebbero servire a reinnescare nella cellula nervosa la capacità di modificare la propria struttura. Più precisamente, possiamo immaginare che un potenziamento permanente della sinapsi tra due cellule possa ultimamente consistere nella crescita di una nuova parte di dendrite del neurone postsinaptico e di assone del neurone presinaptico, con la formazione di nuovi contatti sinaptici. Aumentando il numero dei contatti sinaptici tra le due cellule aumenta in modo stabile e permanente l'efficacia della sinapsi, che è esattamente la definizione di LTP. In conclusione, alcune ore o giorni dall'apprendimento, la traccia mnemonica diventerebbe consolidata sotto forma di nuovi contatti sinaptici tra i neuroni che sono stati attivati di più dall'esperienza che ha generato il ricordo.

1.7 Plasticità nei mammiferi adulti

Da quanto esposto appare chiaro che le di modificazioni plastiche nell'animale in via di sviluppo sono da attribuire in massima parte ad un processo di adattamento dovuto anche ai fisiologici mutamenti dell'organismo in corso di evoluzione. Il problema consiste nel valutare se le capacità plastiche del sistema nervoso vengono mantenute durante tutta la vita. A tal proposito diversi studi hanno dimostrato che, seppur in misura minore, la plasticità di alcuni circuiti neuronali è mantenuta anche in età avanzata. Molte evidenze sperimentali di plasticità nell'adulto vengono da studi effettuati sui mammiferi. Per esempio, una delle condizioni più comuni di plasticità nel mammifero adulto è la reinnervazione collaterale in seguito a denervazione parziale.

Infatti, se dei neuroni vengono denervati in seguito alla lesione di una via nervosa, questi vengono reinnervati dagli assoni contigui superstiti. Ciò avviene sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. Se tuttavia l'innervazione originale viene ripristinata, la reinnevezione collaterale si ritrae (Enright, Zhang, & Murphy, 2007). Questa reversibilità implica un equilibrio fra quei meccanismi che da una parte stimolano la crescita assonale e la sinaptogenesi e dell'altra favoriscono l'involuzione dei terminali assonici e delle sinapsi. Nell'adulto, i neuroni superstiti non sono solo in grado di reinnervare i neuroni che hanno subito la denervazione, bensì essi stessi vanno incontro a modificazioni a livello dell'albero dendritico. Queste modificazioni consistono in un'ipertrofia dei dendriti, indicando che l'aumento del territorio d'innervazione di un neurone e la configurazione dei dendriti procedono in parallelo.

Un altro tipo di plasticità nervosa nel mammifero adulto riguarda i neuroni che vengono separati dal loro bersaglio. In tal caso, il neurone così sconnesso perde gran parte dei contatti sinaptici sul soma e sui dendriti. Anche in questo caso, tali cambiamenti sono reversibili, in quanto il ripristino della connessione fra neurone e bersaglio determina la ricomparsa delle sinapsi originarie sul soma e sui dendriti. Non solo le sinapsi, ma anche l'organizzazione e la ricchezza dell'albero dendritico vanno incontro a modificazioni quando il neurone viene separato dal suo bersaglio. Tali modificazioni consistono essenzialmente in un'involuzione dei dendriti, fenomeno che ben si correla con la riduzione delle sinapsi. Anche la riduzione dell'albero dendritico è reversibile (Zhang, Boyd, Delaney, & Murphy, 2005). A questo punto è necessario porsi la seguente domanda. Questi fenomeni plastici nel mammifero adulto avvengono solo in seguito a lesioni oppure sono presenti anche nel sistema nervoso normale? La distinzione è fondamentale poiché se è vera la prima ipotesi, la plasticità nell'adulto rappresenterebbe semplicemente un fenomeno reattivo in seguito a lesioni e manipolazioni sperimentali. Al contrario, se è vera la seconda ipotesi, l'aumento e la diminuzione delle sinapsi, dei dendriti e dei terminali assonici rappresenterebbe un normale processo fisiologico che avviene continuamente, giorno dopo giorno, nel sistema nervoso dei mammiferi adulti. Molti studi dimostrano che è vera la seconda ipotesi (Murphy & Corbett, 2009).

Le recenti tecnologie di videomicroscopia permettono di seguire in vivo l'evoluzione dei dendriti, delle sinapsi e degli assoni dei neuroni. In altre parole, è possibile identificare un singolo neurone nell'animale vivo e descriverne le modificazioni morfologiche a diversi intervalli di tempo. Per esempio, si è visto che la distribuzione e il numero delle sinapsi di un singolo neurone in un ganglio parasimpatico cambiano nel

tempo. Il neurone parasimpatico è stato osservato nuovamente dopo 23 giorni e si è vista una modificazione della disposizione e del numero delle sinapsi. Altri neuroni, analizzati allo stesso modo, hanno mostrato cambiamenti dell'albero dendritico ad una distanza di tempo di 3 mesi. Tali cambiamenti consistevano sia nella retrazione e nell'estensione di dendriti già esistenti sia nella comparsa di nuove branche dendritiche.

Da tutti questi studi effettuati nei mammiferi adulti emergono almeno 3 punti importanti:

- 1) I neuroni dei mammiferi adulti sono in grado di rimodellarsi dopo lesioni e manipolazioni sperimentali.
- 2) Tale rimodellamento è reversibile, indicando un equilibrio fra meccanismi evolutivi e meccanismi involutivi.
- 3) I neuroni adulti vanno incontro a modificazioni plastiche che sono simili a quelle presenti durante lo sviluppo (per esempio, reinnervazione collaterale).

1.8 Plasticità delle mappe sensoriali nei primati adulti

Uno degli aspetti più studiati della plasticità del sistema nervoso centrale riguarda le mappe sensoriali, cioè quelle aree della corteccia cerebrale dove esiste un'organizzazione topografica della superficie del corpo (Holtmaat & Svoboda, 2009).

Una delle più studiate mappe sensoriali è quella esistente a livello dell'area somatosensoriale primaria (S-I), nella quale le diverse parti del corpo sono rappresentate in maniera ordinata. Questa topografia della superficie corporea non è statica, nel senso che può andare incontro a modificazioni e rimodellamenti in circostanze particolari.

Nella scimmia è stata studiata la riorganizzazione della mappa sensoriale in S-I in seguito a lesioni di diverse parti del corpo. Per esempio, l'amputazione di un dito produce un rimodellamento neuronale a livello di S-I. Tale rimodellamento consiste nella scomparsa della rappresentazione del dito amputato in S-I e nell'espansione delle rappresentazioni delle dita adiacenti. In tal modo, un'area di corteccia cerebrale di S-I che prima conteneva le informazioni provenienti dal dito amputato, ora contiene informazioni provenienti dalle dita adiacenti. Questo tipo di riorganizzazione non avviene solo in seguito ad amputazione di una parte del corpo, ma anche in seguito a lesione a livello del sistema nervoso centrale. Per esempio, S-I proietta topograficamente all'area somatosensoriale secondaria (S-II). Se nella scimmia viene effettuata una lesione in S-I a livello dell'area di rappresentazione della mano, S-II va incontro ad un rimodellamento simile a quello che abbiamo prima descritto. In altre parole, la zona di rappresentazione della mano in S-II scompare e viene occupata dall'espansione delle rappresentazioni della faccia, del piede e del tronco. Anche in questo caso, dunque, una zona di corteccia cerebrale in S-II che normalmente conteneva la rappresentazione della mano, ora contiene le rappresentazioni della faccia, del piede e del tronco. Tutto ciò avviene in seguito a lesioni, o di una parte del corpo o del sistema nervoso centrale.

Tuttavia, anche nel caso della riorganizzazione delle mappe sensoriali non è necessaria una lesione per osservare questi fenomeni plastici. Diversi studi (Pons, Garraghty, Ommaya, Kaas, Taub, & Mishkin, 1991) hanno infatti dimostrato che l'esperienza tattile è di per sé in grado di modificare la mappa sensoriale in S-I. Per esempio, nella scimmia si può produrre un'iperattività dei recettori tattili di alcune dita della mano

mediante un'iperstimolazione meccanica per alcune ore al giorno per diverse settimane. Se il secondo e il terzo dito di una mano vengono iperstimolati in tal modo, dopo alcune settimane si può osservare in S-I un ingrandimento della rappresentazione corticale delle dita iperattive, che si espande a scapito delle rappresentazioni delle altre dita. Questo significa che l'esperienza tattile influenza l'organizzazione delle mappe sensoriali della corteccia cerebrale. Studi più dettagliati hanno dimostrato che un tale rimodellamento non avviene solo a livello della corteccia cerebrale, ma anche a livello di altre strutture sottocorticali, come il talamo (Tarsa & Goda, 2002).

I meccanismi plastici alla base di una tale riorganizzazione sono almeno di due tipi. Il primo riguarda la reinnervazione collaterale e quei processi di crescita ed espansione dei terminali assonici. In tal caso, la modificazione delle mappe sensoriali richiede un certo periodo di tempo (giorni, settimane o mesi) ed è strettamente connessa con la costruzione di nuove vie nervose e di nuovi circuiti neuronali. Il secondo meccanismo riguarda invece un tipo di plasticità che possiamo definire funzionale. Infatti, è spesso possibile osservare la riorganizzazione di una mappa sensoriale a poche ore da un'amputazione. Questo breve periodo di tempo suggerisce che in alcuni casi il rimodellamento plastico avviene sulla base di circuiti neuronali già esistenti ma non funzionanti. In tal caso, una lesione o un'iperstimolazione attiverebbero circuiti nervosi che normalmente sono silenti.

Appare chiaro come la comprensione di tutti questi meccanismi sia di fondamentale importanza per sviluppare strategie atte a potenziare i fattori favorevoli al rimodellamento delle mappe sensoriali nell'adulto. In particolare, sarà di primaria importanza capire se tale rimodellamento è connesso con il recupero funzionale in seguito a lesioni periferiche e centrali.

1.9 Plasticità nelle lesioni cerebrovascolari

I dati sperimentali descritti fino ad ora hanno un riscontro clinico immediato anche nell'uomo. Infatti, quando parliamo di lesioni sperimentali a livello del sistema nervoso centrale, il corrispettivo clinico è rappresentato da lesioni di varia natura e origine, come per esempio quelle vascolari. Perciò, la lesione sperimentale effettuata nell'animale è una simulazione di una condizione patologica che produce nell'uomo la distruzione di una porzione più o meno ampia di tessuto nervoso. Se torniamo per un momento al concetto di lesione dell'area S-1 nella scimmia, è bene sottolineare come la distruzione di una porzione dell'homunculus somestesico sensoriale possa avvenire in seguito ad un danno cerebrale nell'uomo. In tal caso è verosimile che le mappe sensoriali si modifichino dopo un certo periodo di tempo (Griffin, Hudson, Belhaj-Saif, & Cheney, 2009).

Questi dati sono perciò fondamentali per comprendere i meccanismi di recupero funzionale in seguito ad un danno cerebrovascolare. Non solo le mappe, ma anche altri circuiti neuronali vanno incontro a fenomeni di reinnervazione collaterale, ipertrofia o ipotrofia dell'albero dendritico e modificazione delle sinapsi. Per esempio, il tessuto nervoso contiguo ad un'area di infarto o emorragia cerebrale è in grado di riorganizzarsi in base ai fenomeni di involuzione e morte cellulare che sono avvenuti nell'area della lesione (Fridman, Hanakawa, Chung, Hummel, Leiguarda, & Cohen, 2004).

Tale concetto rientra in quei fenomeni che vanno sotto il nome di funzioni vicarianti, le quali rappresentano la base del recupero parziale o totale in seguito a lesione. Non è detto che la genesi di nuove sinapsi, dendriti e terminali assonici sia il solo meccanismo di plasticità che avviene intorno alla zona della lesione. Per esempio, abbiamo visto precedentemente come circuiti neuronali e vie nervose silenti possano ad un certo punto diventare funzionanti e quindi esser responsabili di una parte del recupero da una lesione. Ancora una volta, tutti questi meccanismi necessitano un approfondimento nell'ambito della ricerca di base e della ricerca clinica al fine di sviluppare tecniche e strategie capaci di potenziare i fenomeni plastici nell'organismo adulto. In particolare, sarà necessario potenziare tutti quei fenomeni plastici che sono strettamente connessi al recupero funzionale in seguito ad una lesione cerebrale.

Parte seconda

2.La Stimolazione Transcranica a Correnti Dirette (tDCS)

Il principio di utilizzare l'elettricità per modulare l'attività cerebrale ha origini molto antiche. Nella prima metà del I sec. A. C. le torpedini venivano poste sullo scalpo dei pazienti i quali, grazie alla scarica elettrica trasmessa dal pesce vivo, trovavano sollievo dal dolore (ScriboniusLargus, 1529). Un utilizzo simile si ritrovava presso i Greci all'epoca di Galeno e presso i Romani, come si evince dalle testimonianze di Plinio il Vecchio (Kellaway, 1946).

Grazie allo studio delle torpedini iniziato sistematicamente con il metodo scientifico moderno da Walsh (1773), nacque l'elettrofisiologia, di cui i maggiori rappresentanti in Italia furono Galvani a Bologna e Volta a Pavia. Le correnti galvaniche (DC) furono impiegate soprattutto per il trattamento dei disturbi mentali, come dimostra lo studio dell'applicazione delle DC su pazienti sofferenti di melanconia effettuato da Aldini (1804), il quale le sperimentò prima su se stesso riportando insonnia ed attivazione nei giorni successivi.

La Stimolazione Elettrica Cranica (CES) fu usata fin dall'Ottocento per il trattamento della depressione, tuttavia i risultati contrastanti sulla DC, portarono ad un suo abbandono, soprattutto dagli anni '30 del secolo scorso, quando Bini e Cerletti (1940) scoprirono la terapia Elettroconvulsiva (ECT), la quale provoca un'attività convulsiva a differenza della tDCS che, invece, modula l'attività neuronale spontanea senza provocare crisi epilettiche ne perdita di coscienza .

I lavori di Lynn J.Bindman negli anni '60 sull'azione della polarizzazione esercitata da brevi correnti sulla corteccia cerebrale dei topi (1964), portarono ad una rinascita degli studi sull'argomento, finche nel 1998 Alberto Priori, in collaborazione con alcuni colleghi sviluppo un nuovo approccio che utilizza impulsi elettrici a bassa intensità: la stimolazione transcranica a correnti dirette (tDCS).

I successivi esperimenti di Nitsche e Paulus (2000) rilevarono che, per ottenere una modifica nell'eccitabilità neuronale attraverso la tDCS, fosse critica la posizione degli elettrodi sullo scalpo poiché le interazioni tra il campo elettrico e l'architettura neuronale influenzano fortemente il flusso di corrente. I due ricercatori, inoltre, osservarono come la tDCS produca effetti che perdurano oltre la stimolazione in base all'intensità ed alla durata di quest'ultima. Essi stabilirono infine che gli effetti della tDCS dipendono anche dal tipo di stimolazione: quella anodica incrementa l'attività corticale, quella catodica la inibisce.

Nonostante i limiti della bassa risoluzione temporale e della localizzazione anatomica, la tDCS sta mostrando risultati significativi in ambito clinico e riabilitativo per diversi disturbi neuropsicologici, psicologici e psichiatrici, come la depressione, il dolore cronico, i deficit linguistici e motori conseguenti ad ictus.

2.1 Modalità di funzionamento della tDCS

La tDCS è costituita da un generatore di corrente costante che emette un flusso di corrente a bassa intensità (0-2 mA)(Figura 1). Gli studi recenti solitamente utilizzano un'intensità di 1mA, rispettando i limiti di sicurezza individuati da Agnew e McCreery (1987), che indicano come densità massima di carica quella di 40FC/cm². Sono stati compiuti molti studi dagli anni '60 ad oggi per capire quali siano i meccanismi sottostanti il funzionamento della tDCS. Studi sistematici sui pazienti cominciarono negli anni 70 con il trattamento della depressione (Baker, 1970), ma si ottennero risultati spesso contrastanti la cui causa era da ricercare soprattutto nella mancanza di criteri psichiatrici rigorosi. Lippold e Redfearn (1964), applicando una corrente diretta di intensità compresa tra 50 e 500 mA su 32 soggetti sani, rilevarono che la stimolazione anodica determinava un aumento dell'attività motoria, ed un aumento dello stato di attivazione dei soggetti, mentre evidenziarono che la stimolazione catodica evocava uno stato di inibizione generale .

Priori et al.(1998) dimostrarono che la stimolazione anodica ad un'intensità di 0.5mA seguita da quella catodica causava una depressione dei potenziali evocati motori (MEPs), giungendo all'ipotesi che la stimolazione anodica agisse iperpolarizzando gli interneuroni superficiali dell'area motoria corticale oppure all'ipotesi alternativa secondo cui la stimolazione anodica provocasse una depolarizzazione facilitando l'attività degli interneuroni inibitori superficiali.

Nitsche e Paulus (2000) ottennero un effetto inverso: individuarono, come meccanismo alla base della tDCS, la sua proprietà di modificare la polarizzazione della membrana neuronale per cui la stimolazione anodica provocherebbe un incremento dell'attività neuronale spontanea conseguente alla depolarizzazione della membrana, mentre la stimolazione catodica avrebbe l'effetto contrario confermando le ipotesi di Lippold e Redfearn (1964). Nell'esperimento Nitsche e Paulus individuarono le aree da stimolare tramite la stimolazione transcranica magnetica (TMS), quindi fissarono gli elettrodi su tali aree, il catodo sull'area sinistra rappresentante il muscolo adduttore breve del pollice, l'anodo sulla corteccia orbitale controlaterale erogando un'intensità di corrente di 1 mA e successivamente misurarono i potenziali evocati motori (MEPs), scoprendo che gli effetti della stimolazione duravano oltre la stimolazione stessa in modo proporzionale all'intensità ed alla durata di questa. I due studiosi ipotizzarono che la genesi di tale fenomeno fosse dovuta ai meccanismi del potenziamento a lungo termine (LTP) ed alla depressione a lungo termine (LTD), come evidenziato dagli studi di Moriwaki (1991), Islam e colleghi (1995) e Malenka e Nicoll (1999). In un esperimento successivo su 5 soggetti, Priori e colleghi utilizzarono gli stessi parametri di Nitsche e Paulus, rilevando che, mentre la stimolazione anodica lasciava quasi inalterato il livello di attivazione spontaneo, quella catodica provocava un forte decremento dei MEPs.

Studi successivi hanno investigato i meccanismi alla base degli effetti prolungati oltre l'applicazione della tDCS. Ardolino, Bossi, Barbieri e Priori (2005) condussero un esperimento su 17 volontari sani destrimani di età compresa tra i 24 ed i 40 anni, suddividendolo in 4 fasi. Applicarono l'elettrodo catodico sull'area motoria destra, quello anodico in sede sovra orbitaria sinistra uno sul polso in direzione del nervo ulnare e l'altro sul ginocchio ipsilaterale: questo per indagare se gli effetti duraturi delle correnti dirette necessitano di sinapsi, in quanto il modello di stimolazione periferica non coinvolge le sinapsi, ma solo l'eccitabilità

assonica. Nell'esperimento furono utilizzati anche la stimolazione transcranica magnetica (TMS), la stimolazione elettrica (TES) e l'elettroencefalogramma (EEG) e la registrazione dei potenziali evocati motori (MEPs). L'esperimento dimostrò che la stimolazione catodica produce effetti duraturi e funzionali sia nel sistema nervoso centrale sia nel sistema nervoso periferico, causando cambiamenti nell'eccitabilità assonica periferica, nella polarizzazione della membrana neuronale e nell'ampiezza dei potenziali evocati motori (MEPs), la quale riflette l'eccitabilità della rete intra corticale intra-neuronica, che dipende dall'attività sinaptica; tuttavia nel sistema nervoso periferico i cambiamenti dell'eccitabilità assonica erano in direzione inversa a quelli del sistema nervoso centrale, infatti, dopo la stimolazione catodica, l'eccitabilità assonica non decrementava ma aumentava.

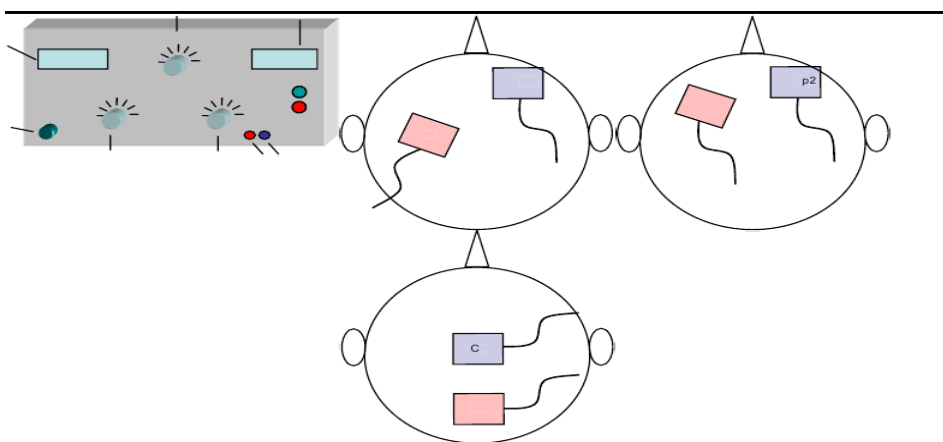


Figura 1. Stimolatore transcranico tDCS e modalità di applicazione degli elettrodi.

2.2 Campi di applicazione della tDCS

Un'evoluzione recente degli studi di tDCS nell'uomo deriva dalla combinazione di questa metodica con tecniche di neuroimaging funzionale, che hanno permesso di documentare la riduzione o l'aumento del flusso ematico e del metabolismo nell'area stimolata a seguito di tDCS della corteccia motoria (Pascual leone et al., 1998; Fox et al., 1997). I possibili meccanismi alla base degli effetti della tDCS come già detto possono essere spiegati attraverso il potenziamento e la depressione a lungo termine (*aftereffect*) della trasmissione sinaptica corticale o di meccanismi neuronali strettamente connessi ad essa. Studi su animali suggeriscono, inoltre, che la modulazione dei neurotrasmettitori e l'induzione genica possano contribuire a spiegare alcuni degli effetti modulatori a lungo termine (Keck et al., 2000).

Uno studio recentemente condotto da (Reus et al., 2008) sugli effetti indotti dalla tDCS nella depressione avallava l'ipotesi che l'episodio depressivo è da attribuire alla riduzione di serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) a livello cerebrale. Studi PET che avvallano tale ipotesi mostrano come la risoluzione dell'episodio depressivo ristabilisca la concentrazione di tali amine biogene a livello del nucleo caudato e dei lobi frontali (Reus et al., 2008). A tal proposito, la tDCS, così come altre tecniche di stimolazione che utilizzano correnti elettriche (Strafella et al., 2001; Gershon et al., 2003), si è dimostrata in grado di modificare il rilascio di noradrenalina, serotonina e dopamina (Briones et al., 1973; Giordano, 2006).

Una seconda ipotesi attribuisce l'episodio depressivo ad un cambiamento di *neuroplasticità*. Secondo tale ipotesi la patologia sarebbe associata ad una riduzione della neuroplasticità in determinate aree del sistema nervoso (Bessa et al., 2008; Sairanen et al., 2007). Sono molti, infatti, gli studi che hanno mostrato l'associazione tra il trattamento efficace dell'episodio depressivo e l'aumento dei livelli di Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), indicatore indiretto di plasticità neuronale (Brunoni et al., 2008; Sens et al., 2008). A tal riguardo, la tDCS è capace di indurre cambiamenti plastici del cervello. E' quindi ipotizzabile l'utilizzo della tDCS per ottenere cambiamenti plastici di determinati circuiti neuronali allo scopo di determinare un miglioramento della sintomatologia depressiva. Inoltre con tale metodica, al contrario di quanto avviene con la terapia farmacologica, è teoricamente possibile direzionare i cambiamenti a zone specifiche stimolando la sinaptogenesi in alcune aree e inibendola in altre. La tDCS, sembra avere enormi potenzialità anche nel recupero dalla disabilità conseguente al danno ischemico cerebrale. Varie evidenze suggeriscono che, dopo un ictus, si instauri uno squilibrio di tipo maladattativo tra i due emisferi cerebrali: l'aumento dell'eccitabilità dell'emisfero sano, privato delle afferenze inibitorie transcallosali provenienti dall'emisfero leso, costituirebbe un ostacolo al recupero funzionale. Il rationale dell'uso della stimolazione cerebrale nell'ictus consiste quindi nell'indurre una facilitazione dell'attività neuronale nell'emisfero leso o un'inibizione nell'emisfero controlaterale (Hummel & Cohen, 2006).

Nelle indagini condotte con la stimolazione transcranica a correnti dirette sugli animali si è visto che la stimolazione anodica provochi una facilitazione nel mostrare risposte incondizionate ed un miglioramento nell'apprendimento (Morrel et al., 1962; Yamaguchi et al., 1975; Albert, 1966; Rosen, 1972). Negli studi sugli umani è stato documentato che la stimolazione anodica incrementa l'eccitabilità delle corteccie motoria e visiva, migliora l'apprendimento motorio, diminuisce i tempi di risposta ed incrementa la fluenza verbale (Nitsche et al., 2003; Priori, 2003; Iyer, 2004). Gli studi che utilizzano la tDCS per indagare la memoria di lavoro si sono focalizzati sulla stimolazione della DLPFC, soprattutto sulla parte sinistra.

L'indagine di Fregni e collaboratori (2005) ha prodotto risultati molto interessanti: 10 soggetti (età media 47 anni circa) con deficit cognitivi in seguito ad ictus sono stati sottoposti a due condizioni sperimentali: stimolazione anodica e simulata della DLPFC sinistra. Prima e durante la somministrazione i soggetti dovevano svolgere un compito di memoria di lavoro, di cui venivano misurati accuratezza e tempi di risposta. I risultati hanno rilevato che solo dopo la stimolazione anodica della DLPFC sinistra avveniva un miglioramento nella prestazione dei compiti di memoria a breve termine.

Un ulteriore ambito di applicazione della tDCS nello studio e nella riabilitazione dei processi mnesici riguarda l'apprendimento motorio, che coinvolge le corteccie motoria primaria, premotoria e supplementare, i nuclei talamici, lo striato e il cervelletto. Gli studi sull'apprendimento motorio si sono focalizzati sulla stimolazione di M1, la corteccia motoria primaria (Reis et al., 2008) ed hanno documentato che la stimolazione anodica di M1 durante un compito motorio migliora la prestazione in compiti di apprendimento di movimenti sequenziali delle dita (Vines et al., 2006), in compiti di coordinazione visuo-motoria (Antal et al., 2004), nei tempi di reazione in blocchi di sequenze apprese inconsapevolmente (Nitsche et al., 2003), nel

test di funzionalità della mano di Jebsen Taylor (JTT) usato anche nei pazienti con ictus per sondare le attività quotidiane, come il raccogliere piccoli oggetti (Jebsen et al., 1969).

La tDCS si è dimostrata uno strumento molto efficace nella riabilitazione linguistica dei soggetti affetti da afasia non fluente. Risultati interessanti sono stati ottenuti da Baker e colleghi (2010), i quali hanno somministrato a 10 pazienti con afasia non fluente post stroke una sessione di stimolazione della durata di 5 giorni. I pazienti ricevevano una corrente di 1mA per 20 minuti al giorno sull'area frontale sinistra durante un trattamento per l'anomia. I risultati hanno evidenziato un miglioramento significativo nell'accuratezza della denominazione degli item in seguito alla stimolazione anodica. Inoltre gli effetti perduravano ancora una settimana dopo la fine della sessione di stimolazione.

La tDCS è stata ancora utilizzata per investigare il ruolo causale dell'area di Broca nell'apprendimento della grammatica artificiale da de Vries e colleghi (2010), che hanno sottoposto 38 soggetti sani alla tDCS anodica (1 mA per 20 min.) e simulata dell'area di Broca durante il processo di apprendimento, scoprendo che nel compito successivo di classificazione i soggetti sottoposti alla stimolazione anodica avevano una prestazione migliore nell'identificare le violazioni sintattiche.

In un esperimento di Boggio e collaboratori (2009) su 10 pazienti (4 uomini e 6 donne) con diagnosi di AD è stato dimostrato che la tDCS di tipo anodico migliora le prestazioni dei soggetti in compiti di memoria di riconoscimento visivo. I soggetti erano sottoposti a 3 condizioni sperimentali: ricevevano una corrente di intensità di 2 mA per 30 minuti con l'elettrodo anodico posto in corrispondenza della corteccia temporale sinistra nella prima condizione, sulla corteccia prefrontale dorso laterale sinistra nella seconda condizione e infine la terza condizione era quella simulata o di controllo. In ogni condizione il catodo era posto sull'area sopraorbitale destra.

Durante la stimolazione erano valutati: l'attenzione selettiva tramite il test di Stroop, la memoria di lavoro con test di DigitSpan e, infine, la memoria di riconoscimento con compiti di memoria visiva (i soggetti guardavano delle figure su uno schermo e successivamente venivano presentate altre o le stesse figure e i pazienti dovevano indicare se fossero già apparse in precedenza).

I risultati dell'esperimento hanno evidenziato che dopo la tDCS (sia della corteccia temporale sinistra, sia di quella prefrontale dorsolaterale sinistra) avveniva un miglioramento nei compiti di memoria di riconoscimento visivo non riconducibili ad effetti dell'attenzione in quanto ne nel test di Stroop e nel DigitSpan avevano ottenuto risultati significativi. I ricercatori hanno ipotizzato che la stimolazione anodica agisca da facilitatore, in quanto l'area cerebrale stimolata diventa più reattiva nella fase di codifica del materiale.

Uno studio recente (Boggio et al., 2006) ha mostrato che la stimolazione transcranica a correnti dirette di tipo anodico della corteccia motoria migliora le prestazioni motorie dei soggetti con malattia di Parkinson. In questo studio i pazienti sono stati sottoposti alla stimolazione della corteccia motoria primaria e alla stimolazione della corteccia prefrontale.

La stimolazione della corteccia motoria primaria ha prodotto miglioramenti nelle funzioni motorie i cui effetti perdurarono diverse settimane. La stimolazione della corteccia prefrontale ha dato risultati discordanti,

ma potrebbe essere utilizzata nel trattamento della depressione causata dalla malattia di Parkinson, inoltre, lo studio di Boggio e collaboratori (2006) su 18 pazienti (12 uomini e 6 donne) con PD ha mostrato che la stimolazione anodica della corteccia prefrontale dorsolaterale sinistra ad un'intensità di 2 mA esercita un effetto benefico sulla memoria di lavoro, grazie all'incremento nell'attività della corteccia stimolata.

Diverse evidenze suggeriscono che l'uso combinato della tDCS con altre pratiche riabilitative tradizionali possa favorire i processi di neuroplasticità (Schlaug e coll., 2008). Negli esperimenti sugli animali, Plautz e collaboratori (2003) hanno ottenuto miglioramenti significativi associando l'uso dell'arto paralizzato con la stimolazione elettrica della corteccia motoria primaria (M1) omolaterale ed hanno notato un'espansione della rappresentazione dell'arto nella corteccia.

L'esperimento di Nair e collaboratori (2008) ha analizzato gli effetti riabilitativi di 5 giorni consecutivi di sessioni simultanee multiple di terapia occupazionale della durata di 60 minuti (OT, basata sul paradigma di Bobath) e stimolazione catodica esimitata della corteccia motoria primaria (M1) controlaterale alla lesione in 10 soggetti colpiti da ictus. I pazienti sono stati sottoposti a fMRI e TMS (per verificare la presenza dei MEPs) ed a test motori quali il Fugl-Meyer, il Wolf Motor Functioned il ROM (scala di misura del movimento attivo-passivo). Sono stati misurati la percentuale media di miglioramento nel ROM ed i punteggi al Fugl-Meyer prima ed dopo la terapia. I risultati hanno evidenziato un miglioramento significativo nel ROM in seguito alla stimolazione catodica attiva, che perdurava oltre una settimana circa dalla fine del trattamento. I ricercatori hanno attribuito tale effetto alla diminuzione dell'attività inibitoria esercitata dall'emisfero sano (quello stimolato con la tDCS) su quello lesionato.

Un'indagine che evidenzia gli effetti positivi della combinazione della tDCS con la stimolazione nervosa periferica (PNS) e quella di Celnik e colleghi (2009) a cui hanno partecipato 9 soggetti colpiti da ictus ischemico unilaterale di età compresa tra 40 e 73 anni con gravi deficit motori.

Lo studio consisteva di 5 sessioni di cui una di familiarizzazione con il compito e 4 sperimentali: tDCS + PNS; PNS + tDCS simulata; tDCS + PNS simulata; tDCS simulata + PNS simulata. I soggetti dovevano eseguire una sequenza di pressione di tasti su una tastiera con le dita della mano paralizzata. La PNS era applicata sui nervi mediano ed ulnare attraverso due elettrodi posizionati sul polso, con un'intensità di 1 Hz per 2 ore. La tDCS era somministrata con l'anodo sull'area motoria primaria ipsilaterale alla lesione e il catodo sull'area sopraorbitale controlaterale per 20 minuti all'intensità di 1 mA. Nella tDCS simulata il generatore veniva spento dopo un minuto. Nella condizione di PNS simulata venivano stimolati i nervi di tibia e perone della gamba paretica per due ore. Il compito di apprendimento motorio veniva eseguito dopo la fine di ogni tipo di stimolazione per eliminare elementi di distrazione. I risultati hanno mostrato che la combinazione di tDCS anodica e PNS della mano paralizzata aumenta significativamente l'accuratezza nello svolgimento del compito ad un livello maggiore rispetto all'uso di una delle due tecniche sfruttata singolarmente; inoltre, gli effetti persistevano circa una settimana dalla conclusione dell'esperimento.

Solo recentemente, grazie al lavoro di Polania et al. (2012), si è potuto dimostrare che la tDCS applicata su M1 induce modificazioni sulla sincronizzazione del tracciato EEG e sull'organizzazione topologico-funzionale dei soggetti sani, modificando in maniera significativa le coerenze in tutte le bande di frequenza

studiate (theta, alfa, beta, gamma). La letteratura sembra concordare sul fatto che la stimolazione elettrica a correnti dirette aumenti la coerenza dei ritmi cerebrali, e che ci sia una relazione tra gli effetti funzionali della tDCS e l'aumento di interazioni inter- ed intraemisferiche.

La possibilità fornita dalla tDCS di modificare, a lungo termine, l'eccitabilità di diverse aree della corteccia cerebrale ha dato una forte spinta innovativa nell'ambito delle neuroscienze per le possibili implicazioni terapeutiche di questa metodica, potenzialmente utile per regolare livelli patologicamente aumentati o ridotti di attività corticale ma nonostante sia ormai comprovata l'efficacia, la letteratura è priva di studi che siano focalizzati sull'uso di queste metodiche in soggetti affetti da encefalopatie che riconoscono un sostrato di origine genetica e nelle patologie cognitive croniche ad eziopatogenesi acquisita e degenerativa. Su queste basi nelle ricerche che di seguito verranno presentate abbiamo progettato degli studi in cui si utilizza la tDCS quale strumento per studiare la responsività comportamentale e i meccanismi della neuroplasticità nelle diverse condizioni patologiche.

Parte terza

3. La Sindrome di Rett

La sindrome di Rett è una patologia progressiva dello sviluppo neurologico che colpisce principalmente le bambine, con un'incidenza stimata di circa 1/10.000 nati femmina .

Fu riconosciuta per la prima volta da Andreas Rett (1966), un medico austriaco, a seguito di un'osservazione casuale nella sua sala di aspetto di due bambine che mostravano movimenti stereotipati delle mani molto simili tra loro. A seguito di questa osservazione, Rett, riesaminando le schede di alcune pazienti viste in precedenza, individuò altri casi con caratteristiche comportamentali e anamnesi simili e pubblicò nel 1966 un articolo in lingua tedesca che descriveva questa nuova entità clinica. Tuttavia la pubblicazione fu ignorata per anni. A risvegliare l'interesse e a far riconoscere universalmente l'esistenza della RTT fu uno studio pubblicato in lingua inglese nel 1983 da parte di un gruppo europeo di neurologi infantili .

Dopo la descrizione dei primi casi, il fenotipo RTT è stato progressivamente ampliato e, oltre alla forma classica, sono state descritte cinque varianti: la variante di Zappella (o variante a linguaggio conservato), la variante con convulsioni ad esordio precoce, la variante congenita, le "forme fruste" e la variante a regressione tardiva .

Dal punto di vista genetico, dato che la RTT colpisce soprattutto le bambine, i primi studi hanno ipotizzato una trasmissione X-legata dominante con letalità nei maschi emizigoti.

Tuttavia, dato che la maggior parte dei casi si presenta in forma sporadica, è stato difficile mappare il locus della malattia attraverso studi di associazione.

Nel 1998, grazie allo studio di una serie di rari casi familiari RTT, è stato possibile identificare la regione critica in Xq28. Nel 1999 lo screening mutazionale di geni candidati inclusi nella regione ha permesso l'identificazione di *MECP2* come causa della forma classica. Nei successivi dieci anni sono stati compiuti numerosi passi avanti anche nella comprensione delle cause delle varianti RTT.

Nel 2000 è stato dimostrato che anche la variante di Zappella è causata da mutazioni nel gene *MECP2* .

Nel 2005 è stato dimostrato che un secondo gene localizzato sempre sul cromosoma X, *CDKL5*, è coinvolto nella variante con convulsioni ad esordio precoce.

Recentemente è stato identificato *FOXG1*, localizzato sul cromosoma 14, come il primo gene autosomico associato alla RTT, in particolare alla variante congenita .

Questi risultati hanno dimostrato che la RTT presenta eterogeneità genetica oltre che clinica ed hanno fornito le basi molecolari per comprendere i meccanismi patogenetici della malattia e per disegnare strategie terapeutiche mirate.

3.1 Tratti clinici della forma classica

La RTT presenta un caratteristico decorso clinico divisibile in quattro stadi .

L'anamnesi prenatale e perinatale è normale sebbene, retrospettivamente, possono essere osservati lievi segni della malattia come occasionali movimenti stereotipati o posture distoniche .

Dopo un periodo di circa 6-18 mesi, le bambine presentano un arresto dello sviluppo (stadio I, di stagnazione), seguito da una fase di regressione (stadio II). In questo stadio (1-4 anni), si ha perdita delle abilità precedentemente acquisite come l'uso finalistico delle mani e il linguaggio verbale. Inoltre è evidente un rapido declino delle interazioni sociali, associato alla comparsa di tratti autistici. Le bambine manifestano movimenti stereotipati involontari delle mani quali torsione, lavaggio e congiunzione sulla linea mediana.

Sono inoltre presenti bruxismo e anomalie del respiro come apnee ed iperventilazione. In questo stadio, si manifesta un rallentamento della crescita della circonferenza cranica che spesso risulta in microcefalia (impropriamente definita microcefalia acquisita). Nello stadio successivo (stadio III), detto di pseudostagnazione (4-7 anni), si assiste ad una diminuzione della sintomatologia autistica e ad un miglioramento nelle interazioni sociali, nonostante che l'incapacità di parlare, l'aprassia e le stereotipie manuali persistano. Diventa più evidente l'iposviluppo somatico, la scoliosi e spesso compaiono crisi convulsive. Il quarto e ultimo stadio (5-15 anni) è caratterizzato da un progressivo deterioramento globale che può giungere fino alla condizione di tetraparesi spastica (stadio IV di degenerazione motoria tardiva).

3.2 Tratti clinici delle forme varianti

In aggiunta alla forma classica, sono state descritte cinque varianti RTT che differiscono per età d'insorgenza e gravità dei sintomi.

La *variante di Zappella (Z-RTT) o variante con conservazione del linguaggio (Preserved Speech Variant)*, descritta per la prima volta da Zappella nel 1992, è la più comune. Tale variante presenta un decorso clinico più favorevole. Le pazienti, diversamente dalle RTT classiche, presentano in genere una circonferenza cranica normale, la cifoscoliosi è più lieve e l'ipoevolutismo somatico è ridotto, talvolta con tendenza al sovrappeso.

Durante il terzo stadio, le pazienti acquisiscono nuovamente alcune abilità precedentemente perdute come il linguaggio verbale. Alcune pazienti sono in grado di pronunciare solo poche parole mentre altre riescono a comunicare anche con frasi complesse. Si osserva un miglioramento nell'uso delle mani, sebbene persista una considerevole disprassia e siano presenti i classici movimenti stereotipati. La loro capacità motoria migliora a tal punto che alcune bambine sono anche in grado di salire e scendere le scale autonomamente.

Nella *variante con convulsioni ad esordio precoce*, descritta per la prima volta da Hanefeld nel 1985, il periodo iniziale è mascherato dall'insorgenza di convulsioni, solitamente in forma di spasmi in flessione. La comparsa delle convulsioni è accompagnata da un ritardo dello sviluppo psicomotorio. Solo più tardi le bambine sviluppano le caratteristiche tipiche della RTT come le stereotipie manuali, soprattutto di tipo "hand-mouth". Inoltre la circonferenza cranica, il peso e l'altezza sono normali nella maggior parte dei casi.

Nella *variante congenita*, il ritardo psicomotorio è evidente sin dai primi mesi di vita, spesso con ipotonia e alterazioni precoci dell'EEG. Nei mesi successivi compaiono i vari stadi precedentemente descritti nella sindrome classica e possono comparire convulsioni generalizzate.

Le "*forme fruste*" sono varianti RTT che non presentano le tipiche caratteristiche della malattia.

In genere il primo stadio compare più tardi (1-3 anni). Le bambine mostrano sintomi iniziali più lievi e hanno un deterioramento clinico più protratto nel tempo.

Solitamente conservano una qualche forma di linguaggio e le anomalie evolutive sono molto meno evidenti.

Le classiche stereotipie delle mani possono essere atipiche o del tutto assenti. Il quadro clinico diventa più simile alla RTT quando queste bambine arrivano all'adolescenza e all'età adulta.

Le bambine con la *variante a regressione tardiva* sono di rarissima osservazione. In queste varianti, lo stadio I è più protratto nel tempo e la regressione può insorgere durante le scuole elementari.

3.3 Genetica nella Rett

Per molti anni, mancando dei marker biologici, la diagnosi della Sindrome di Rett si è basata esclusivamente sui criteri clinici. Un cambiamento in tal senso è stato possibile nel 1999, quando è stato inserito nel processo diagnostico l'esame genetico. La Dott.ssa Huda Zoghby e i suoi colleghi, hanno identificato la causa della Sindrome di Rett in un difetto del gene MECP2 posto sulla regione Xq28 del cromosoma X.

Ad oggi mutazioni del gene MECP2 [Xq28] sono rinvenute nella maggioranza (90%) dei casi di Rett classica e nel 30% circa dei casi di Rett atipica.

L'esistenza di tanti soggetti in cui, a fronte di un sospetto clinico anche ben documentato di RTT non vengano identificate alterazioni del gene MECP2 ha portato a supporre l'esistenza di eterogeneità genetica.

Tra il 2004 e il 2005 sono state identificate mutazioni su un altro gene, il gene CDKL5 anch'esso situato sul cromosoma X a livello della banda citogenetica Xp22 in soggetti affetti da una forma di Rett atipica caratterizzata dall'insorgenza precoce di epilessia farmaco-resistente (variante di Hanfield) (Weaving et al., 2004; Tao et al., 2004; Scala et al., 2005).

Il gene MECP2 fu descritto per la prima volta nel 1992 (Meehan et al., 1992). MECP2 si trova sul braccio lungo del cromosoma X in corrispondenza della banda citogenetica q28 (Adler et al., 1995; D'Esposito et al., 1996; Vilain et al., 1996). Il gene MECP2 occupa una porzione di DNA genomico di circa 76 Kb e viene trascritto in direzione telomero-centromero. Benché sia espresso in modo ubiquitario i suoi livelli di espressione sembrano essere regolati in modo tessuto e sviluppo specifico in particolare a livello neuronale (Jung et al., 2003; Balmer et al. 2003; Cohen et al., 2003; Kishi et al., 2004; Mullaney et al., 2004).

MECP2 consta di 4 esoni che codificano 2 diverse isoforme della proteina, indicata come MeCP2, dovute a splicing alternativo dell'esone 2. Le due isoforme di MeCP2 differiscono quindi solo nella porzione N-terminale. L'isoforma più abbondante, MeCP2B, contiene gli esoni 1-3 e 4 mentre l'isoforma MeCP2A gli esoni 2, 3 e 4., (Kriaucionis & Bird, 2004; Manatzakanian et al., 2004). Fino a oggi sono state identificate più di 300 differenti varianti patologiche di questo gene.

Lo spettro di mutazioni identificate comprende mutazioni missense, nonsense, come anche grandi delezioni e duplicazioni dell'intero gene (RETT Base , HGMD). Le mutazioni MECP2 sono distribuite lungo l'intera sequenza codificante del gene e il 70% delle alterazioni finora riportate è riconducibile a 8 varianti ricorrenti, tutte transizioni C>T (Lee et al., 2001), probabilmente risultanti dalla deaminazione spontanea dei residui citosina a livello dei nucleotidi:(c.316C>T, c.397C>T, c. 473C>T, c.502C>T, c.763C>T, c. 808C>T, c. 880C>T, c.916C>T).

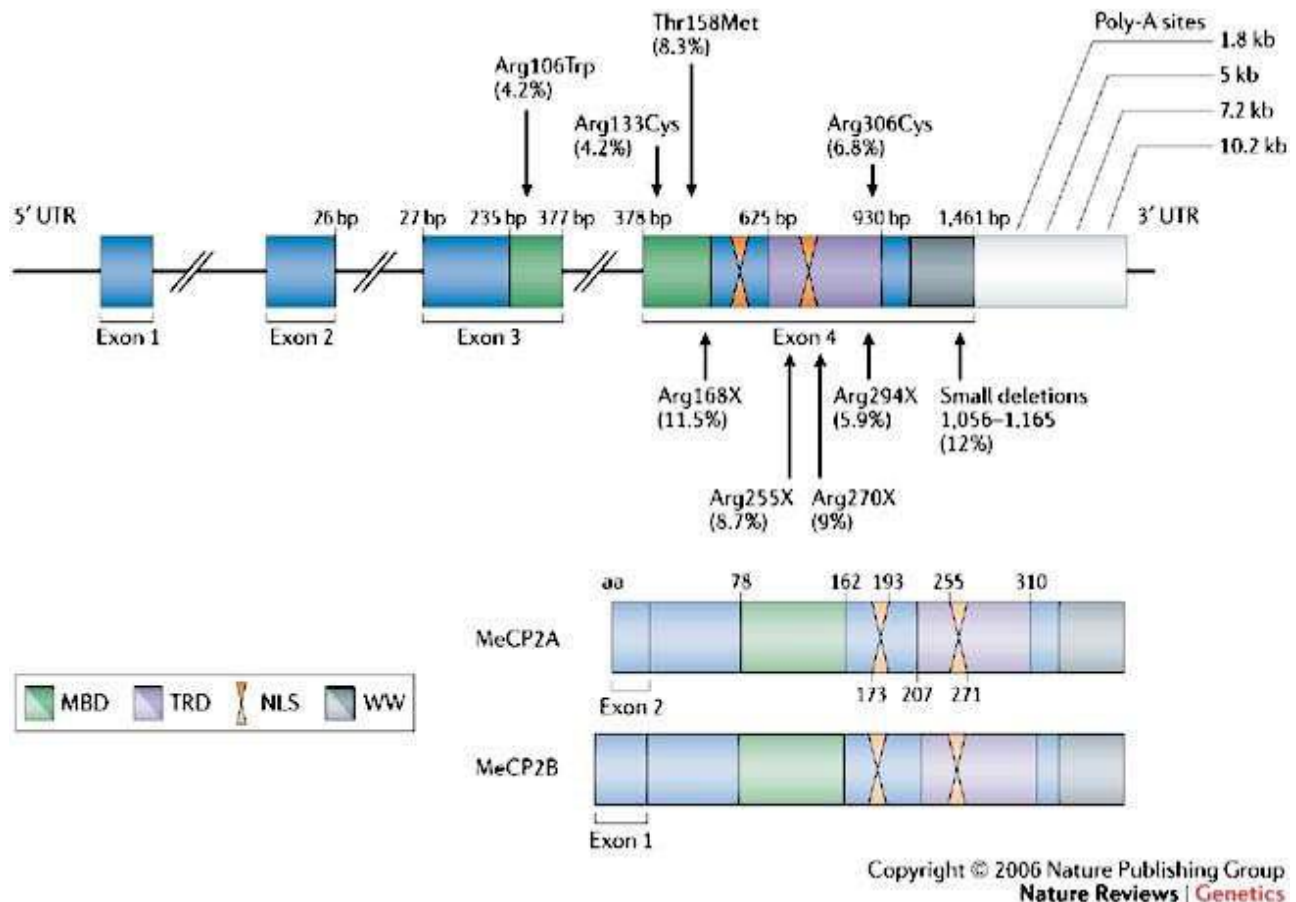


Figura 2: Gene MECP2. Nella parte alta della figura è rappresentato il gene MECP2 con i suoi domini funzionali, le frecce indicano le mutazioni "hot-spot". Nella parte inferiore della figura sono rappresentati le due isoforme MeCP2A e MeCP2B.

Queste mutazioni sono la causa di circa il 63% delle alterazioni di MECP2 fino ad ora annotate e portano a:

- una proteina molto più piccola del normale a causa di una prematura terminazione della sintesi
- una proteina che viene rapidamente distrutta dalla cellula
- una proteina che avendo una conformazione sbagliata non può svolgere le sue normali funzioni.

Negli ultimi anni si è cercata una correlazione tra genotipo e fenotipo, ovvero se sia possibile prevedere quale sarà la gravità della malattia in base alla mutazione riscontrata.

Si pensa che le bambine caratterizzate da una mutazione troncante tardiva, cioè con una mutazione in MECP2 che interrompe la proteina verso l'estremità terminale (C-terminale) presentano un quadro

sintomatologico meno severo e che maggiormente si discosta dalla forma classica della sindrome di Rett, rispetto alle pazienti con mutazioni missenso o che interrompono presto la sintesi della proteina (troncanti precoci). Inoltre, la mutazione Arg 270X (dove X sta ad indicare la fine della sintesi della proteina) è associata con un aumento della mortalità, in accordo con un generale aumento della gravità della malattia in caso di una mutazione all'interno del TRD 29 o che interrompe la proteina prima di questa regione proteica. La previsione di quale sarà la condizione del singolo paziente in funzione del difetto molecolare è purtroppo complicata sia dal fenomeno dell'inattivazione dell'X che da quello che viene definito il background genetico. Proprio a causa di una preferenziale inattivazione dell'X e/o del background genetico può verificarsi che una mutazione missenso in MECP2 o una troncante tardiva originino talvolta una forma classica e altre un'atipica della Rett.

3.4. Ruolo di MECP2 nello sviluppo dei neuroni

Studi recenti hanno dimostrato che MECP2 è espresso in più neuroni differenziati ed è coinvolto nella maturazione e nel mantenimento dei neuroni compresi l'arborizzazione dendritica e le proiezioni assionali. Le mutazioni MECP2 sembrano dunque svantaggiare lo sviluppo neuronale.

Originariamente è stato ipotizzato che fosse un repressore trascrizionale globale, ma prove recenti suggeriscono che esso può avere un ruolo chiave nel regolare l'espressione dipendente dall'attività neuronale di geni specifici quali il BDNF.

La distribuzione temporale e spaziale di MECP2 durante lo sviluppo umano è abbondante nei neuroni maturi ed ha un pattern di espressione che correla con l'ontogenesi del SNC, prima con il midollo spinale e poi con la corteccia cerebrale. I neuroni Cajal Retzius, sono i primi ad esprimere MECP2 seguiti poi da quelli talamici, dai neuroni corticali profondi e dai neuroni della corteccia cerebellare. L'espressione nei gangli della base, nell'ipotalamo, nell'ippocampo e negli strati superficiali della corteccia appare più tardi, ed il numero di neuroni positivi a MECP2 continua ad aumentare fino a 10 anni di età.

MECP2 è espresso nei neuroni prima della sinaptogenesi e potrebbe essere così coinvolto nel mantenimento o nella modulazione delle sinapsi (Zoghbi et al., 2003).

3.5 Il gene CDKL5

Sebbene le mutazioni in MECP2 giustifichino quasi il 95% dei casi di sindrome di Rett classica, sono state identificate solo nel 30-40% dei casi atipici. Questo dato aveva portato 33 diversi gruppi di ricerca ad ipotizzare che altri geni potessero essere responsabili dell'insorgenza della malattia. In accordo con ciò alla fine del 2005 è stato pubblicato che il gene CDKL5, anch'esso situato sul cromosoma X, può essere responsabile dell'insorgenza di una forma di Rett atipica caratterizzata dalla precoce insorgenza di convulsioni generalmente intrattabili farmacologicamente (variante di Hanefeld). Dalla prima pubblicazione ad oggi sono state riportate più di 14 diversi tipi di mutazioni a carico di CDKL5 e ci si è resi conto che le mutazioni in questo gene sono una frequente causa di gravi forme di ritardo mentale femminile associate a crisi epilettiche che si manifestano nei primi mesi di vita.

Il gene CDKL5 si trova sul braccio corto del cromosoma X a livello della banda citogenetica Xp22 e comprende 23 esoni (Montini et al., 1998; Kalscheuer et al., 2003). I primi tre esoni sono trascritti ma non tradotti e sembra contengano due siti di inizio della trascrizione alternativi, l'ATG d'inizio e localizzato all'interno dell'esone due.

Dal punto di vista funzionale CDKL5 codifica per una proteina con attività chinasi, cioè in grado di fosforilare altre proteine, oltre che se stessa; la fosforilazione è una funzione importante perché rappresenta uno dei segnali di comunicazione fra le proteine all'interno della cellula, che ne favorisce l'attivazione/disattivazione e comunque la variazione della loro funzionalità. La regione preposta a tale importante funzione si chiama dominio catalitico, è codificato dai primi 11 esoni del gene, e contiene 3 siti principali: quello per il legame all'ATP (la molecola che fornisce la energia necessaria perché avvengano tali reazioni di fosforilazione), il sito attivo treonin-chinasi (ove si lega la regione di un'altra proteina che viene fosforilata da CDKL5) e un sito di fosforilazione Thr-Glu-Tyr, cioè una regione consenso dove la proteina CDKL5 può essere fosforilata da altre proteine o da sé medesima.

Il gene CDKL5 viene espresso attivamente nel primo periodo postnatale e, a differenza di MECP2, nel cervello adulto si trova solo nei neuroni, ma non nelle cellule della astroglia, è presente sia nel citoplasma delle cellule in divisione, sia nel nucleo e si trasferisce da un compartimento all'altro, in maniera differente a seconda dell'area del cervello e del momento dello sviluppo (Rusconi, 2008). Nel citoplasma CDKL5 è coinvolto nel rimodellamento actinico e nella morfogenesi neuronale, cioè nella crescita dell'assone, e nell'arborizzazione dendritica.

A livello del nucleo sono state proposte diverse funzioni per la proteina CDKL5: a) studi *in vitro*, hanno dimostrato che CDKL5 interagisce con MECP2 e con la DNA metiltransferasi 1 (DNMT1) (Kameshita, 2008), suggerendo che possa regolare la metilazione del DNA e il legame di MECP2 stesso al DNA, b) studi *in vivo* (Carouge, 2010) in neuroni di ratto dimostrano che MECP2 agisce su CDKL5 reprimendolo. Infatti CDKL5 viene inibito da MECP2 attraverso il legame di quest'ultimo ad una regione ricca di citosine metilate che copre il promotore. Tale scoperta ribadisce il coinvolgimento in un medesimo meccanismo di azione delle due maggiori proteine responsabili della sindrome di Rett; inoltre si è dimostrato che *in vitro* CDKL5 a sua volta fosforila MECP2; quindi il legame fra le due proteine e le due forme della sindrome è duplice: se da un lato le mutazioni in CDKL5 possono alterare la fosforilazione di MECP2, portando nelle bambine con variante Hanefeld, ad un'attività ridotta di MECP2 che genera una serie di sintomi della sindrome di Rett, ci si aspetterebbe viceversa che mutazioni in MECP2 nelle pazienti con Rett classica, che riducono la sua attività di legame alle citosine metilate nella regione a monte di CDKL5, determinino un incremento della espressione di CDKL5, il cui significato sul fenotipo sarebbe interessante da valutare. Infine CDKL5 a livello nucleare sembrerebbe coinvolto in una nuova funzione, poiché co-localizza a livello di regioni specifiche dette 'nuclearspeckles' dove si trovano i fattori che regolano il 'taglio'(splicing) dell'RNA, molecola che rappresenta la fase di transizione dal gene alla proteina. Sia l'over-espressione che un abbassamento della quantità di CDKL5 portano ad una alterazione di tali strutture, mediata probabilmente dalla sua attività di fosforilazione sulle proteine che fanno parte dei 'nuclearspeckles' (Broccoli).

3.6 Analisi mutazionale

La sensibilità clinica del test di screening per CDKL5, cioè la possibilità di identificare pazienti positive fra le pazienti di sesso femminile con caratteristiche Rett-like ma negative all'analisi per MECP2 è riportata pari al 7,8%, valore che sale al 14,3% se come criterio diagnostico si aggiunge l'insorgenza di epilessia precoce e farmaco resistente prima dei tre mesi di età (Intusoma, 2011), che rappresenta quindi il tratto fenotipico principale in grado di indirizzare il clinico a suggerire l'analisi per la paziente.

Ad oggi sono state identificate in letteratura circa 80 pazienti con mutazione in CDKL5, fra cui anche 13 maschi. La maggior parte delle mutazioni, circa 50, sono puntiformi, cioè interessano uno o pochi nucleotidi della sequenza e comunque sono evidenziabili tramite la tecnica del sequenziamento. Si tratta di mutazioni missenso all'interno del dominio catalitico, mutazioni non senso causanti la terminazione prematura della proteina, distribuite lungo l'intera sequenza del gene, varianti di splicing e mutazioni frameshifts. Le rimanenti 30 interessano delezione di regioni più estese, comprendenti uno o più esoni del gene, e non possono essere evidenziate con la tecnica precedente, ma con la tecnica dell'MLPA o della PCR quantitativa (Real Time). Fra i pazienti con grandi delezioni in letteratura sono stati identificati anche 5 pazienti maschi. Ciò evidenzia come, oltre alla presenza di mutazioni puntiformi, anche la completa assenza (i maschi avendo un solo cromosoma X non presentano una copia non mutata del gene) di regioni estese del gene, non solo sia compatibile con la vita, ma determini un fenotipo paragonabile a quello osservato nelle femmine. In tal senso la minor frequenza osservata di mutazioni nei pazienti maschi (circa il 5% fra i soggetti con encefalopatia epilettica, rispetto al 14% nelle femmine) (ShwannLinag, 2011), potrebbe essere dovuta semplicemente al fatto che la sindrome di Rett è classicamente considerata una patologia che colpisce le bambine e quindi vi sia alla base una parzialità o pregiudizio clinico nel suggerire l'analisi di CDKL5 ai maschi con fenotipo Hanefeld, col risultato che un numero minore di maschi vengono identificati.

Sono inoltre stati osservati anche alcuni pazienti a mosaico, cioè in cui solo una quota di cellule presentano l'alterazione genetica in CDKL5, sia con mutazione puntiforme (Masliah-Plachon, 2010), sia con grandi delezione (Bartnik, 2011), in entrambi i generi. Questo succede perché in tali pazienti la mutazione è il risultato di un evento post-zigotico, cioè non ereditato né insorto nei gameti dei genitori, ma generatosi solo in alcune cellule dell'embrione in stadi precoci del suo sviluppo. Ci si aspetterebbe che tali pazienti abbiano un quadro clinico più sfumato, tuttavia la correlazione è difficile, soprattutto nelle femmine dove alla variabilità tissutale dovuta al grado di mosaicismo, si aggiunge anche quella che dipende dal pattern di inattivazione del cromosoma X, che può variare da sangue periferico al tessuto cerebrale.

3.7 Il gene FOXG1

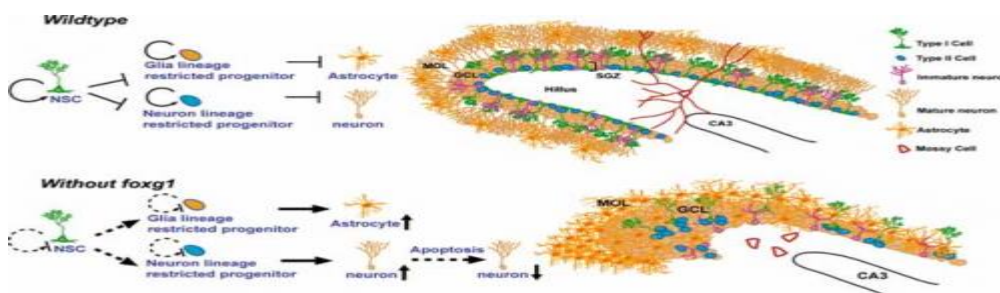
Nel 2005 viene descritta una paziente con grave disabilità intellettiva, agenesia del corpo calloso, difetti di mielinizzazione parietale e frontale nell'insula, microcefalia e dismorfismi, grave ipotonia, ritardo psicomotorio, assenza di linguaggio, forte interazione con lo sguardo, convulsioni cerebrali e tetraplegia. La paziente è portatrice di una traslocazione bilanciata $t(2;14)(p22;112)$ e fiancheggiante un'inversione di 720 kb in 14q12, de novo, che comprende parte di un fattore di trascrizione, FOXG1B (Shoichet et al, 2005). Studi sul modello animale e altri vertebrati dimostrano un'associazione genetica diretta tra il fenotipo del paziente e quello del modello di topo ko (privo di una delle due copie del gene) Foxg1 di topo. Successivamente sono stati identificati mediante array-CGH altri 4 casi con delezione de novo che includevano FOXG1 (Bisgaard et al., 2006). Nel 2008 il gruppo della prof Renieri, in seguito allo studio eseguito mediante la metodica array CGH di una coorte di pazienti con sospetta sindrome di Rett senza mutazioni nei geni MECP2 e CDKL5, identifica, in una paziente con forma congenita nella regione 14q12, una delezione di circa 3Mb che contiene il gene FOXG1. Il sequenziamento del gene FOXG1 in altre 53 pazienti mette in luce la presenza di 2 pazienti con mutazione puntiforme (Ariani et al., 2008; Papa et al. 2008). Le caratteristiche cliniche osservate nelle bambine e la funzione del gene suggerivano FOXG1 come un gene responsabile della malattia in una quota pazienti. Ad oggi sono stati descritti 28 pazienti con difetto in FOXG1, tra cui 20 femmine e 8 maschi; in 9 casi si tratta di riarrangiamenti cromosomici ed in 19 di mutazioni puntiformi. Si è venuto sempre più definendo un quadro clinico peculiare associato all'assenza in eterozigosi del gene FOXG1, che in parte è sovrapponibile alla sindrome Rett, ma non del tutto, alimentando il dibattito sulla possibile definizione di un sindrome di FOXG1 (Kortum et al., 2011). Le caratteristiche cliniche condivise con la sindrome di Rett sono il ritardo cognitivo grave con assenza di linguaggio, l'ipotonia, le stereotipie manuali/discinesie, le crisi epilettiche generalizzate, i movimenti a scatti, la microcefalia postnatale severa, disturbi del sonno, ed un lieve ritardo di crescita. Sintomi non presenti nella sindrome Rett che si osservano nei pazienti con mutazioni nel gene FOXG1 sono una facies con dimorfismi peculiare, prevalente in presenza di anomalie cromosomiche, lo scarso contatto oculare, l'aprassia, l'ipogenesia del corpo calloso, un pattern semplificato di pachigia frontale, movimenti corei formi, distonia e spasticità (Kortum et al., 2011).

3.8 Struttura e funzioni di FOXG1

Il gene FOXG1 codifica per un fattore di trascrizione, denominato Forkhead box protein G1, che viene espresso nel cervello fetale ed adulto e nei testicoli. La proteina interagisce con alcune molecole fondamentali per la regolazione della trascrizione, nello specifico con il repressore trascrizionale JARID1B e con la famiglia delle proteine Groucho che hanno il ruolo di corepressori globali della trascrizione. Questa funzione è di particolare importanza per le fasi precoci dello sviluppo del cervello. Come MeCP2 regola la trascrizione di alcuni geni legandosi indirettamente alle iston-deacetilasi e al DNA metilato (Ariani et al, 2008; Fisher & Caudy, 2008).

Questa proteina è importante durante lo sviluppo embrionale del cervello per la maturazione dei neuroni;

è dimostrato che se presente in quantità ridotta FoxG1 determina una prematura maturazione delle cellule nervose associata ad una riduzione delle dimensioni del telencefalo, (parte più esterna del cervello) e ad un'ipoplasi (limitato sviluppo) del corpo calloso osservato nelle pazienti. Recentemente è stato dimostrato in esperimenti su modelli animali che la proteina FoxG1 non solo è fondamentale per la maturazione embrionale del telencefalo, ma continua ad essere espressa anche nel cervello adulto. Alcuni esperimenti hanno evidenziato come nel cervello adulto di topo, l'espressione indotta di FoxG1 possa bloccare la morte delle cellule nervose ed al contrario la soppressione della sua espressione possa indurre la morte anche in cellule sane. Tali evidenze sostengono l'ipotesi che FoxG1 abbia un ruolo nella sopravvivenza neuronale dei neuroni adulti (Dastidar, 2011). Sempre recentemente è stato studiato il ruolo di FoxG1 a livello di una specifica regione del cervello, il giro dentato ippocampale, dimostrando come: la sua assenza promuova la neurogenesi di neuroni e delle cellule della glia, si produce un numero maggior numero di queste cellule che porta ad un'alterata organizzazione, viene a mancare la corretta stratificazione e come conseguenza si manifesta l'apoptosi (morte) delle cellule stesse.



Un ipotetico modello della funzione di Foxg1 nello sviluppo dell'ippocampo

In presenza di Foxg1, nel giro dentato, una regione del cervello che è rappresentativa dello sviluppo cerebrale, le cellule del sistema nervoso centrale e i precursori continuano a proliferare mantenendo un pool di progenitori normali mentre il corpo cellulare rimane in una regione precisa, strato sub granulare. In mancanza di Foxg1 questo strato si presenta con una notevole malformazione del giro dentato (Tian et al., 2012). È importante osservare come l'identificazione di nuove proteine il cui deficit è alla base dello sviluppo di forme atipiche della sindrome di Rett ci permetta di capire meglio le relazioni tra le molecole che guidano la maturazione e lo sviluppo del cervello e che appaiono strettamente correlate. Ciò aggiunge nuovi tasselli per la comprensione dei processi che dal difetto genetico portano alla sintomatologia clinica delle pazienti, ed in futuro al miglioramento dei problemi delle piccole pazienti.

3.9 L'instabilità neuronale : il ruolo delle neurotrofine nella patogenesi della sindrome di Rett

La RS si caratterizza per un iniziale sviluppo nella norma che in un secondo momento subisce una drammatica regressione . Un recente studio di (Azmitia et al., 2006) ha approfondito l'aspetto dell'instabilità neuronale come possibile responsabile dell'arresto e della regressione dello sviluppo psicomotorio nelle bambine affette da RS. Secondo tale principio i neuroni possono maturare o regredire nel corso della vita . Ciò dipende dal mantenimento delle neurotrofine la cui presenza è continuamente richiesta per la realizzazione di un fenotipo maturo.

I neurotrasmettitori come la serotonina , la dopamina e la norepinefrina la cui sintesi è direttamente correlata ai fattori neurotrofici , sembrano funzionare come fattori di mantenimento della crescita dal momento che devono essere sempre presenti per fornire la loro azione maturativa. Un basso tasso di queste sostanze determina il fluire da un fenotipo maturo a uno immaturo (Pizzamiglio, 2003). Più precisamente i cambiamenti plastici nel cervello non procedono linearmente da immaturi nell'infanzia a maturi nell'età adulta infatti le terminazioni dendritiche si estendono o si ritraggono in relazione alla produzione dei fattori neurotrofici.

Le monoammine, sembrano dunque importanti per i processi di sinaptogenesi e trofismo del sistema nervoso centrale. Nello specifico una disfunzione del sistema dopaminergico riflette negativamente a livello del sistema mesolimbico, meso-cortico-frontale e nigrostriatale, strutture che esplicano funzioni quali l'attenzione, la percezione, l'intenzione, la motricità la comunicazione la costanza percettiva e comportamentale. I livelli di questi neurotrasmettitori risultano fortemente ridotti nelle bambine affette dalla RS dato che correla con le gravi turbe cognitive e comportamentali.

3.10 Le neurotrofine nella Rett

Le neurotrofine sono un gruppo eterogeneo di polipeptidi in grado di regolare una serie di funzioni cellulari quali il differenziamento, la crescita e il trofismo cellulare. I principali neuro peptidi che fanno parte di questa famiglia sono il nerve grow factor (NGF) , il brain derived neurotrophic factor (BDNF) la neurotrofin -3 (NT-3) , la neurotrofin 4/5 (NT4/5) ed altri fattori scoperti recentemente , quali il ciliary neurotrophic factor (CNTF) e il glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), che è il più potente fattore di sopravvivenza dei neuroni dopaminergici e noradrenergici del locus cereuleus e dei motoneuroni spinali.

La famiglia delle neurotrofine (NTs) è quindi composta da proteine strutturalmente simili che hanno un ruolo importante nella regolazione , nel differenziamento e funzionamento di differenti popolazioni neuronali sia a livello del SNC che periferico. Per questo motivo le NTs sono attualmente al centro di molti studi nell'ambito delle neuroscienze atti a comprendere non solo il ruolo fisiologico di queste molecole , ma anche il loro possibile coinvolgimento nelle patogenesi di alcune malattie che colpiscono specifiche popolazioni neuronali .

L'NGF è stato per la prima volta identificato a seguito degli studi pionieristici del premio nobel Rita Levi Montalcini nel 1986 , nei sarcomi e in seguito nel veleno dei serpenti e nelle ghiandole salivari dei topi maschi. Oggi è noto che l'NGF è prodotto da una grande varietà di cellule del sistema nervoso centrale e

periferico dei mammiferi incluso l'uomo. L'NGF la cui sintesi è regolata da molecole endogene quali, gli ormoni tiroidei i corticosteroidi e le citochine, è abbondante a livello della corteccia frontale, nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel midollo spinale. L'NGF esercita un'azione trofica sui neuroni colinergici del prosencefalo basale in particolare a livello del setto mediale del nucleo basale di Meynert della banda diagonale di Broca. Molto importanti sono le funzioni svolte dal BDNF la cui sintesi sembra essere correlata a MECP2 interviene a due livelli:

- 1) localmente per attivare e stabilizzare le sinapsi
- 2) distalmente a livello del soma cellulare per modificare l'espressione genica e i cambiamenti fenotipici.

Il ruolo del BDNF nella sindrome di Rett è stato analizzato manipolandone l'espressione nei cervelli post-natali di topi con deficit a carico di MECP2. Questi studi hanno dimostrato che con la sotto espressione di BDNF si registra una precoce accelerazione della malattia mentre una sovra espressione di BDNF determina una più lenta progressione.

Questo risultato indica che la manipolazione di BDNF potrebbe rappresentare un'opportunità terapeutica per i pazienti affetti da RS.

PARTE TERZA SEZIONE SPERIMENTALE (STUDIO 1)

Studio pilota:effetti della tDCS e del potenziamento cognitivo nella sindrome di Rett

3.11.Obiettivi

Dall'analisi della recente letteratura emerge chiaramente l'importanza della riabilitazione il cui scopo è sia quello di suscitare conoscenze che non sono comparse nel corso dello sviluppo, sia di recuperare delle competenze funzionali che le bambine hanno perso nel corso della malattia, ma nasce un'altra necessità, ovvero quella di trovare delle nuove strategie terapeutiche che si avvalgano anche dell'utilizzo di metodiche tecnologiche presenti nel panorama attuale delle neuroscienze cognitive quali le tecniche di neurostimolazione cerebrale. Nel nostro studio abbiamo pertanto ipotizzato che la tDCS, somministrata in associazione al potenziamento cognitivo, possa influenzare positivamente le capacità linguistiche e l'apprendimento in un gruppo di bambine affette dalla SR .

E' ipotizzabile che l'utilizzo della tDCS possa indurre i processi di sinaptogenesi cerebrale andando ad intervenire indirettamente su quei meccanismi cellulari che inducono la promozione e la produzione dei fattori di crescita neuronale (BDNF). Sono molti, infatti, gli studi che hanno analizzato l'associazione tra il trattamento tDCS e l'aumento dei livelli di Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), indicatore indiretto di plasticità neuronale (Brunoni et al., 2008; Sens et al., 2008). Inoltre con tale metodica, al contrario di quanto avviene con la terapia farmacologica, è teoricamente possibile direzionare i cambiamenti a zone specifiche incrementando la neuroplasticità in alcune aree e inibendola in altre (Fregni et al., 2006a; Bench et al., 1995)

L'intervento specifico sulle bambine con SR si propone quindi di:

- recuperare delle competenze funzionali (linguaggio, attenzione e apprendimento) che, per ragioni genetiche, sono perdute;
- porre una barriera alla regressione funzionale, cercando di modificare la storia naturale della malattia e dominandone la progressione;
- potenziare la citoarchitettura di strutture neurali che sono disfunzionali in questa sindrome.

3.11.2 Partecipanti

Nel periodo compreso tra gennaio e febbraio 2014 presso il Dipartimento di Scienze Cognitive in collaborazione con il CNR con sede presso il Policlinico Gaetano Martino di Messina è stato condotto uno studio pilota su singolo paziente.

Al soggetto sperimentale che per ragioni di privacy chiameremo con le sole iniziali C.A di anni 31 è stata posta diagnosi di sindrome di Rett in base ai criteri clinici e diagnostici previste dalle linee guida internazionali. L'anamnesi remota evidenzia che la ragazza è nata alla 40° settimana di gestazione al termine di parto eutocico con un peso di 2970 g. La lunghezza del corpo è di 53 cm e la circonferenza cranica di 34 cm. Il percorso evolutivo tipico è stato interrotto attorno ai 20 mesi, con l'avvio della regressione clinica tipica della SR e il noto decorso stadiale. L'analisi molecolare del gene MECP2 ha confermato la presenza di mutazioni associate alla SR. Dall'anamnesi prossima emerge che lo sviluppo delle competenze relative allo svolgimento delle attività quotidiane appare gravemente deficitariocosi come le competenze linguistiche, la ragazza utilizza alcuni monosillabi per indicare le persone a lei familiari. La valutazione della sintomatologia attuale è stata eseguita attraverso l'utilizzo di strumenti standardizzati, che permettono un'analisi dei diversi profili di sviluppo neuropsicologici e neurocognitivi e attraverso la ricerca di sintomi specifici e grazie all'osservazione diretta della ragazza.

L'arruolamento dellapaziente è stato condotto nel rispetto dei seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi di sindrome di Rett attestata da adeguata documentazione clinica;
- età compresa tra 18 e 35 anni;
- condizioni neurologiche stabilizzate da almeno 3 mesi;
- presenza del modulo di consenso sottoscritto da persona legalmente autorizzata a tale atto, con allegata copia del provvedimento attestante l'autorizzazione.

I criteri generali di esclusione erano:

- presenza di gravi alterazioni epilettogene all'elettroencefalogramma
- pregressi interventi neurochirurgici
- presenza di impianti intracranici di materiale metallico
- presenza di peacemaker
- assunzione di farmaci condizionanti lo stato di coscienza e vigilanza

3.12 Strumenti neuropsicologici

La paziente è stata sottoposta in base a dopo la stimolazione transcranica (tDCS) alla seguente valutazione neuropsicologica:

- **Vineland** → Valutazione e misurazione del comportamento adattivo
- **R.A.R.S** → Intensità della gravità delle bambine con SR
- **Matrici di Raven (Modified)** → Test non-verbale sul QI
- **Test di Fanzago** per la valutazione articolatoria del linguaggio

3.12.1 Scale di Vineland

Le Scale Vineland per il Comportamento Adattivo (VABS Vineland Adaptive Behaviour Scales *Sparrow, Balla, Cicchetti, 1984*) sono il più noto e utilizzato strumento per la valutazione del comportamento adattivo. Esse permettono di valutare le capacità di autosufficienza personale e sociale nelle situazioni della vita reale, e di osservare come in pratica le abilità cognitive si traducano nella gestione della propria autonomia nella quotidianità.

Attraverso un'intervista semi-strutturata che viene somministrata a un genitore, il comportamento adattivo viene valutato in diversi ambiti di funzionamento: comunicazione funzionale (ricettiva, espressiva e mediante la scrittura), abilità di vita quotidiana (autonomia nell'affrontare i compiti della vita quotidiana in ambito domestico e di comunità), socializzazione (abilità nella gestione delle relazioni interpersonali, del gioco e del tempo libero) e abilità motorie (motricità fine e globale).

La scala Vineland, le cui proprietà psicometriche sono eccellenti, è uno strumento indispensabile nella pratica clinica, e nel 2003 ne è stata tarata e pubblicata la versione italiana.

A livello diagnostico permette di verificare se il livello di adattamento di un individuo nella vita reale è paragonabile a quello dei coetanei, per documentare o meno la presenza di Ritardo Mentale (RM). Dagli anni sessanta infatti è stato introdotto il costrutto di comportamento adattivo nella definizione di RM, e costituisce la seconda dimensione da valutare, insieme all'intelligenza, per compiere una diagnosi di RM.

La strutturazione stessa del protocollo permette di evidenziare potenziali obiettivi terapeutici. Il colloquio permette inoltre di identificare le priorità di intervento dei genitori, e discuterle con loro. Inoltre, nei soggetti in cui si evidenzia uno scarto tra i punteggi ottenuti nei test cognitivi e quelli ottenuti alla scala Vineland, il primo obiettivo perseguibile è ridurre o annullare questa differenza: a partire dal dato delle effettive potenzialità intellettive del soggetto possiamo lavorare affinché esse si esprimano in modo più funzionale possibile nella gestione della propria autonomia. La valutazione del comportamento adattivo, oltre a costituire una necessità diagnostica, permette anche la descrizione delle competenze e delle debolezze dei soggetti, rendendo possibile la pianificazione ed il monitoraggio di interventi mirati all'aumento delle autonomie.

Le Scale Vineland non misurano l'intero insieme delle abilità adattive, ma permettono la rilevazione delle quattro dimensioni che ogni scala dovrebbe rilevare, a loro volta organizzate in sub-domini:

- Comunicazione: ricezione, espressione, scrittura\lettura
- Abilità di vita quotidiana: personali, domestiche, di comunità
- Socializzazione: relazioni interpersonali, gioco e tempo libero, regole sociali
- Abilità motorie: motricità fine e grossolana

Le Scale sono utilizzabili con soggetti di età compresa fra 0-18 anni e 11 mesi, o adulti con disabilità, ogni volta che risulti necessaria una valutazione della prestazione nelle attività quotidiane di un individuo. Possono essere utilizzate per la valutazione e la diagnosi del ritardo mentale, ed i dati riferiti forniscono stime valide e affidabili della posizione che il soggetto occupa rispetto al gruppo normativo dei soggetti normodotati.

Il formato è quello dell'intervista semi-strutturata, somministrata da un operatore specificamente addestrato alla persona che meglio conosce il soggetto. La versione estesa comprende 540 item, organizzati nel questionario per l'intervista in cluster elencati in ordine evolutivo. Gli item all'interno dei cluster sono ordinati per livelli crescenti di completezza della prestazione. Consente una valutazione analitica del CA, e l'identificazione di punti di forza e debolezza del soggetto. Inoltre gli item all'interno dei vari sub-domini sono organizzati in cluster ed elencati in ordine evolutivo, facilitando la programmazione ed il monitoraggio dell'intervento educativo e riabilitativo.

3.12.2 Rett Assessment Rating Scale (R.A.R.S.)

È una scala sviluppata per comprendere l'intensità della gravità della malattia nelle bambine con la sindrome di Rett. La scala valuta l'andamento della malattia e l'andamento della gravità nelle diverse aree di sviluppo (cognitiva, sensoriale, motoria, emotiva, dell'autonomia, delle caratteristiche tipiche di malattia e di comportamento).

La sindrome di Rett presenta, al suo interno una forte variabilità, per cui la valutazione della stessa è difficoltosa. È necessario, quindi, stabilire quali siano le caratteristiche tipiche di questa sindrome, analizzarle e valutarle singolarmente per ottenere una valutazione globale precisa e veritiera.

Ben30 dei 31 items di cui si compone la R.A.R sono stati raggruppati in 6 aree:

1. Area cognitiva.

L'area cognitiva è compromessa nelle bambine con la sindrome di Rett. Probabilmente in seguito alla regressione iniziale, il livello cognitivo si mantiene ad un livello di grave ritardo mentale (Villa, 1998). Considerata la difficoltà di valutare esattamente il grado di ritardo mentale, a causa della gravità dei sintomi della malattia, esistono alcuni indicatori precisi per comprendere il loro sviluppo cognitivo. Gli items inseriti nella R.A.R.S. si riferiscono, quindi, ad una serie di indicatori correlati alle abilità cognitive. Sono relativi alle capacità attentive, all'orientamento spaziale e orientamento

temporale, alla memoria, alla capacità di comunicare verbalmente, alla capacità di comunicazione non verbale, tramite espressioni del viso e capacità di mantenere il contatto visivo e l'attenzione condivisa.

2. Area sensoriale.

Per quanto riguarda quest'area, è noto che le bambine con la sindrome di Rett hanno problemi esclusivamente alla vista, caratterizzata da uno sguardo periferico (Lindberg, 2000) e all'udito, caratterizzato dall'alternanza di ipersensibilità e iposensibilità uditiva (Antonietti, Castelli, Fabio, Marchetti, 2003). Gli item relativi all'area sensoriale sono, quindi, "vista" e "udito".

3. Area motoria.

Le difficoltà motorie delle bambine con la sindrome di Rett riguardano soprattutto la capacità di deambulare e le stereotipie delle mani; infatti tra i criteri di inclusione della sindrome di Rett (Hagberg, Witt Engerstrom, 1987) si trovano "la comparsa delle stereotipie a carico delle mani, quali *"hand-washing"*, *"hand-clapping"*, *"hand-wringing"*"; e la comparsa di andatura atassica e di aprassia del tronco". I criteri di supporto (DiagnosticCriteriaWorking Group, 1988) della sindrome di Rett comprendono scoliosi e problema dei piedi. Per questo, nell'area motoria della R.A.R.S. sono stati inseriti gli items: "corpo", "mani", "scoliosi" e "piedi".

4. Area delle emozioni.

Le persone in contatto con le bambine con la sindrome di Rett riferiscono che è molto facile entrare in contatto con loro: rispondono agli stimoli sociali, ai sorrisi e il loro sguardo è intenso. I loro stati emotivi sono solitamente legati allo stato di benessere (Villa, 1998). Gli items relativi all'area delle emozioni sono: "emozioni di base", per verificare se le bambine riescano ad esprimere le emozioni e emozioni altrui, relativo alla comprensione delle emozioni delle altre persone. Appartenenti all'area delle emozioni sono anche altri due items: "sbalzi d'umore" e "ansia", frequenti nei soggetti affetti dalla sindrome.

5. Area dell'autonomia.

A quest'area appartengono il controllo sfinterico, la capacità di alimentarsi autonomamente e le abilità di lavarsi e vestirsi.

6. Caratteristiche tipiche della sindrome.

Le caratteristiche tipiche della sindrome sono elementi importanti da indagare perchè caratterizzano la malattia e concorrono alla gravità della stessa. Si possono suddividere in caratteristiche di malattia e caratteristiche di comportamento. Le prime comprendono gli items "epilessia", "convulsioni", "crisi di dispnea", "aerofagia". Gli items relativi alle caratteristiche di comportamento sono, invece, "iperattività", "aggressività", "bruxismo", "preferenze alimentari", "crisi oculogiriche", "tensione muscolare. L'ultimo item del test si riferisce all'impressione generale che hanno i genitori o i terapisti che compilano la R.A.R.S. rispetto alla gravità della malattia nella bambina.

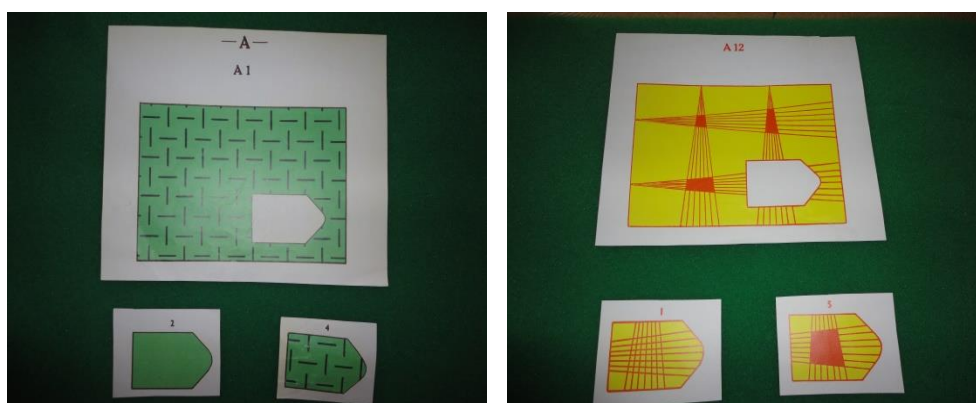
3.12.3 Matrici progressive di Raven

Il test di Raven è un test non-verbale che misura la capacità del soggetto di osservare alcune figure geometriche, cogliere la relazione tra queste ed evidenziare quella che completa la serie. Per permettere al soggetto di comprendere la logica del test le tavole presentate sono di difficoltà crescente. Il numero dei problemi risolti costituisce il punteggio globale del soggetto. Il reattivo Matrici di Raven è stato ideato nel 1940 (Raven 1940) ed è disponibile in quattro versioni principali:

- Progressive Matrices 1938 (Raven, 1938a; 1938b)
- Coloured Progressive Matrices (Raven, 1949)
- Progressive Matrices 1947 (Raven, 1947)
- Standard Progressive Matrices (Raven, 1960)

Le Coloured Progressive Matrices, ideate per bambini dai 5 agli 11 anni, per soggetti adulti con deficit cognitivi e per soggetti con deficit di comprensione linguistica. Queste tavole sono costituite da 3 serie (A, AB, B), la scala globale presenta 36 problemi, le tavole sono colorate con toni vivaci per catturare l'attenzione. Per i soggetti con disabilità motorie è stata ideata anche una forma a incastro, ogni problema è posto su una tavola con una parte mancante dove possono essere inseriti i pezzi mobili che costituiscono le risposte. Non essendo proponibile a soggetti con gravi disabilità agli arti superiori, questo test è stato realizzato in forma più agevole in modo tale da poter essere somministrato alle ragazze con Sindrome di Rett. Ogni problema è stato fotocopiato ingrandendolo nel formato A3 e le 6 risposte sono state ritagliate così da avere dei pezzetti sovrapponibili allo spazio vuoto nella tavola.

Figure 1. Coloured Progressive Matrices modificate tavola A1 e A12



Per quanto riguarda i criteri di somministrazione essi sono stati così stabiliti:

- un item è superato se vi sono almeno 2 risposte giuste su 3;
- se le prime 2 risposte sono giuste è possibile procedere all'item successivo;
- dopo 3 items consecutivi errati si interrompe la prova;
- un item è ritenuto errato anche se vi è una sola risposta giusta su 3.

Per i criteri di valutazione della risposta il contatto oculare è ritenuto risposta positiva così come la coordinazione oculo-motoria (la ragazza guarda lo stimolo e lo tocca o indica con la mano). Se lo sguardo oscilla tra i 2 stimoli è necessario alternare nuovamente la posizione per avere conferma della scelta; se invece il soggetto non fornisce alcuna risposta si può nel caso di precedente risposta positiva riproporre la domanda, se invece la risposta era stata negativa si procede oltre senza ripetere l'item. Anche per questo studio sono state utilizzate le Coloured Progressive Matrices modificate, ma alle ragazze sono state somministrate solo le prime 12 tavole della serie A. La somministrazione è avvenuta tramite presentazione randomizzata “destra-sinistra” ed il numero di risposte affinché si potesse considerare l'item come corretto era di almeno 2 risposte esatte su 3.

3.12.4 Test di Fanzago

Il test di Fanzago è uno strumento utilizzato per la valutazione dell'articolazione fonetica. È costituito da 114 figure, raggruppate in 22 tavole. Il compito del soggetto è la denominazione, spontanea o su ripetizione, di ogni figura presentata. Su un'apposita griglia è possibile segnare se il fonema target è stato prodotto correttamente, o se è stato invece sostituito, omesso o distorto. Nel caso in cui si riscontrino sostituzioni, vengono riportati i fonemi prodotti al posto di quello target. Per semplificare la somministrazione alle bambine e ragazze con Sindrome di Rett, si è realizzata una forma più agevole del test. Operativamente, abbiamo proposto immagini di vita quotidiana e familiare piuttosto che le immagini stilizzate del test originale. Si procede come segue: si presenta al soggetto la figura, gli si chiede di osservarla con attenzione, e gli si chiede cosa è raffigurato. Questa procedura rappresenta un compito di denominazione spontanea. Se il soggetto dopo la prima presentazione non emette nessuna verbalizzazione, come è logico aspettarsi da un individuo con SR, l'intervistatore fornisce uno stimolo che funge da suggerimento, ovvero: pronuncia la prima sillaba che compone il nome della figura target. In questo caso, si verifica un compito di denominazione su ripetizione. Per quanto riguarda i criteri di somministrazione, essi sono stati così stabiliti:

- un' item è superato se vi sono almeno due risposte corrette su tre presentazioni;
- se le prime due prove sono corrette è possibile procedere all'item successivo;
- dopo tre item consecutivi errati si interrompe il test;
- un' item è ritenuto errato anche se vi è una sola risposta corretta su tre presentazioni.

3.12.5 Strumenti per la valutazione Neurofisiopatologica

La valutazione neurofisiologica è stata eseguita mediante la registrazione elettroencefalografica. L'elettroencefalografia (EEG) corrisponde a una rappresentazione grafica delle variazioni spaziali e temporali dei campi elettrici registrati sulla superficie del cranio. Il segnale EEG, generato dai neuroni posti sulla superficie corticale, rappresenta le fluttuazioni spontanee dei potenziali di membrana a livello delle sinapsi cerebrali. L'EEG permette di valutare l'attività elettrica cerebrale, spontanea o evocata, in condizioni di normalità e in situazioni patologiche. Esistono diversi tipi di registrazione EEG che vengono utilizzati a seconda delle specifiche situazioni. L'analisi dell'EEG permette di riconoscere determinati ritmi cerebrali (alfa, beta, theta e delta) e diversi pattern tipici, nel soggetto normale, della veglia e del sonno. Nell'ambito delle patologie neurologiche, l'EEG è utile nello studio dell'epilessia e dei disturbi della coscienza, nelle encefalopatie di varia natura, nei disturbi del sonno nelle patologie neurodegenerative.

La registrazione dei dati EEG in basale nel post test e durante il follow up è stata acquisita utilizzando un amplificatore EEG ed una cuffia precablata costituita da 21 elettrodi posizionati sullo scalpo della paziente in accordo con i parametri previsti dal sistema di misurazione internazionale 10/20 (Figura 2). Il riferimento è stato posizionato su FPz e la terra posteriormente ad Fz, come riportato da precedenti studi (Formaggio et al., 2008; Storti et al. 2012).

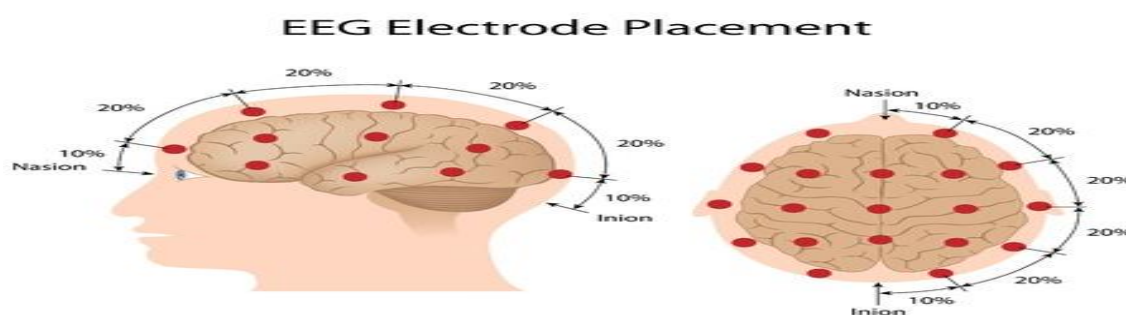


Figura 2 . Sistema di misurazione internazionale 10/20

Oltre ai canali EEG, due canali hanno registrato il segnale elettrocardiografico (ECG) ed elettromiografico (EMG). Il segnale EEG è stato acquisito con una frequenza di campionamento di 258 Hz e sottoposto ad un filtraggio passa banda tra 3-60 Hz, per eliminare le basse e le alte frequenze, e un notch a 50 Hz per eliminare eventuali disturbi di rete. Il segnale elettroencefalografico è stato registrato tramite il sistema Neurowave (Khymeia) che utilizza Brainbox ® EEG-1166 come sistema di acquisizione. Il valore delle impedenze di elettrodo è stato mantenuto al di sotto dei 10 K Ω .

L'analisi dei ritmi EEG è stata effettuata mediante la metodica dell'EEG quantitativa su tutti i 21 canali di registrazione utilizzando un software di analisi automatica del segnale EEG. È stata inoltre effettuata l'analisi spettrale dei ritmi EEG e la diffusione dell'effetto della tDCS è stata studiata su tutti i canali di registrazione. I dati sono stati suddivisi in 4 epoche senza artefatti. L'analisi spettrale è stata valutata trasformando il segnale dal dominio del tempo al dominio della frequenza utilizzando il metodo Welch (Welch, 1967). Le bande prese in considerazione considerati sono state: theta (4 - 7 Hz), alpha (8 - 13 Hz) e beta (14-29 Hz).

Per ogni sito di stimolazione, si è osservato se la rete cerebrale funzionale presenta una struttura di connettività funzionale, in tutte le bande di frequenza EEG: delta (0,5-3,5 Hz), teta (4-7,5 Hz), alfa (8-12,5 Hz), e beta (13-30 Hz), significativamente diversa rispetto ad una configurazione completamente casuale (random). I pattern stimati di connettività funzionale furono caratterizzati da due parametri globali secondo la teoria dei grafi: l'efficienza globale (Eg) della rete, capace di descrivere l'integrazione dei flussi di informazione tra le diverse aree cerebrali, e la modularità misura quanto un network è organizzato in moduli con elevato grado di clustering di alto livello. Tale struttura modulare, si costituisce prevalentemente di diversi gruppi di regioni cerebrali funzionalmente simili fra loro.

3.13 Procedura sperimentale

Per questo studio è stato impiegato un disegno sperimentale su caso singolo ABAA: fase di pre-test (A), training (B), post-test (A') e follow-up (A''). Nel corso della sperimentazione la ragazza è stata sottoposta ad un trattamento di tDCS anodica in associazione al potenziamento linguistico per una durata di 20 minuti per 10 giorni consecutivi.

La valutazione post -test e il successivo follow-up sono stati eseguiti rispettivamente a 10 e 30 giorni distanza.

3.14. Protocollo di neurostimolazione

La tDCS è stata somministrata ad un'intensità di 2 mA, per una durata di 20 minuti per dieci giorni consecutivi, tramite uno stimolatore connesso ad una coppia di elettrodi collegati ad uno stimolatore a corrente costante (tipo HDC stimulation dell'Azienda Omicron T) isolato dalla rete elettrica poiché dotato di alimentazione propria (batterie a basso voltaggio). L'elettrodo attivo è stato collocato sulla regione dello scalpo corrispondente alla regione corticale dell'emisfero dominante responsabile del deficit (area motoria del linguaggio) individuata mediante i riferimenti del sistema internazionale 10-20 per l'elettroencefalografia; l'elettrodo di riferimento è stato applicato in sede cefalica controlaterale .

Il soggetto è stato stimolato con la corrente Anodica (tabella 1). La scelta non è casuale, ma riferita agli studi condotti da Antal(2009) il quale ha studiato gli effetti della tDCS applicata in corrispondenza della corteccia occipitale misurando VEP in Oz. I risultati hanno evidenziato che la stimolazione catodica ha provocato un decremento dell'attività oscillatoria, mentre la stimolazione anodica ha prodotto un aumento significativo. In base a ciò l'attenzione è stata diretta alla stimolazione anodica.

PARAMETRI STIMOLAZIONE ANODICA	
<i>Fronte di salita (FADE IN)</i>	8 secondi
<i>Fronte di discesa (FADE OUT)</i>	5 secondi
<i>Durata</i>	20 minuti
<i>Intensità della corrente</i>	2,0 mA

Tabella 1. Parametri di stimolazione anodica

3.14.1 Protocollo di potenziamento cognitivo linguistico

Il programma di stimolazione cognitivo linguistico è stato esplicito in due distinti stadi della durata di 10 minuti ciascuna. Nel primo stadio il soggetto doveva riprodurre con l'aiuto dello sperimentatore (facilitatore) il nome di immagini appartenenti alle seguenti categorie:

- volti di persone familiari;
- immagini appartenenti alla categoria animali;
- immagini appartenenti alla categoria frutti;
- immagini appartenenti alla categoria oggetti;
- immagini appartenenti alla categoria colori;

Nella seconda fase il soggetto con l'aiuto del facilitatore doveva discriminare e richiamare le immagini di volta in volta presentate a coppie appartenenti alle categorie (volti familiari; animali; frutti; oggetti e colori).

3.14.2 Modalità di codifica delle risposte

Parametro riproduzione:

- Se la vocale, consonante e / o la parola era prodotta correttamente, il punteggio attribuito corrispondeva a 1.
- Se la parola era parzialmente prodotta, il punteggio attribuito corrispondeva a 0,5.
- Se la vocale, consonante e / o parola non era prodotta, o prodotta diversamente, il punteggio attribuito corrispondeva a 0.

Parametro discriminazione della corrispondenza tra parole e immagini

Le prestazioni sono codificate attraverso la seguente modalità di attribuzione del punteggio:

- Guarda il bersaglio e lo tocca con la mano: 1
- Guarda il distrattore e tocca con la mano: 0
- Guarda il bersaglio (l + = sguardo +), ma tocca il distrattore (t- = touch): 0,5

L'azione l + t è stata considerata come una risposta positiva, date le difficoltà che queste ragazze mostrano nel muovere le mani in modo intenzionale o nel coordinamento oculo-motorio. Inoltre, ai fini dello studio, ciò che era importante era il corretto utilizzo dello sguardo come modalità non verbale della comunicazione.

Nelle attività di produzione e di discriminazione, gli stimoli sono stati presentati per 5 volte in ordine casuale destra-sinistra: se la ragazza rispondeva ad ogni presentazione correttamente, veniva attribuito un punteggio massimo di 5; se tutte le risposte erano sbagliate il punteggio minimo ottenuto era pari a zero.

La prestazione era considerata con successo quando venivano fornite 5 risposte corrette.

Parametro coordinazione motoria

Le prestazioni della ragazza sono state codificate come segue:

- non guarda il bersaglio: 0
- guarda il bersaglio (l + = sguardo +), ma tocca il distrattore (t- = touch): 0,5
- guarda il bersaglio: 1
- guarda e muove il suo volto verso il bersaglio: 2
- guarda e si avvicina al bersaglio: 3
- guarda il bersaglio e in parte lo tocca con la mano: 4
- guarda il bersaglio e lo tocca con la mano: 5
- guarda il bersaglio e lo tocca con l'indice: 6
- guarda il distrattore e lo tocca con la mano: 0

3.15 Analisi statistica dei risultati

Al fine di controllare la significatività statistica dei parametri ottenuti attraverso l'intervento combinato tDCS e potenziamento cognitivo è stato utilizzato il Test C(Young, 1941), un test statistico utilizzato nella ricerca clinica per singolo caso. Per quanto concerne i parametri della fase B del trattamento, ovvero numero delle vocali, delle consonanti e delle parole elicitate con denominazione, i valori ottenuti sono stati rispettivamente $Z(10) = 1.54$, $Z(10) = 0.70$, $Z(10) = 0.94$. Dal momento che tutti i valori erano sotto il valore Z critico $1.64(p < .05)$, le tendenze non hanno raggiunto la significatività statistica.

Tuttavia da un'attenta analisi visiva (Figure 1,2,3) emerge che i risultati pur non avendo raggiunto la significatività statistica, evidenziano un importante incremento del numero di vocali consonanti e parole pronunciate dalla ragazza.

Figura 1. Numero di vocali elicitate con denominazione relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

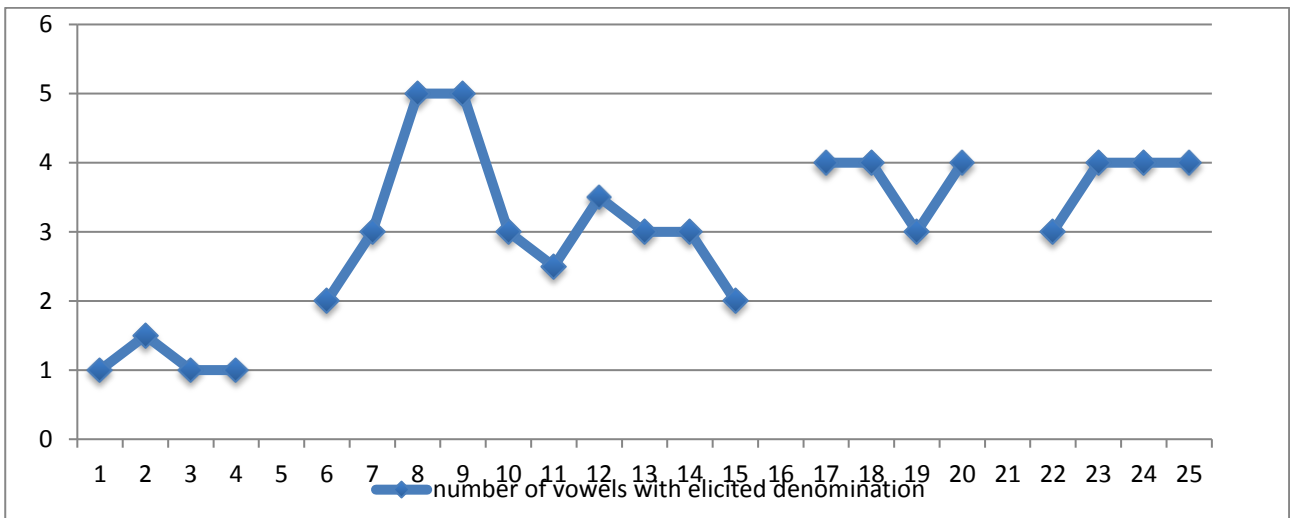


Figura 2. Numero di consonanti elicitate con denominazione relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

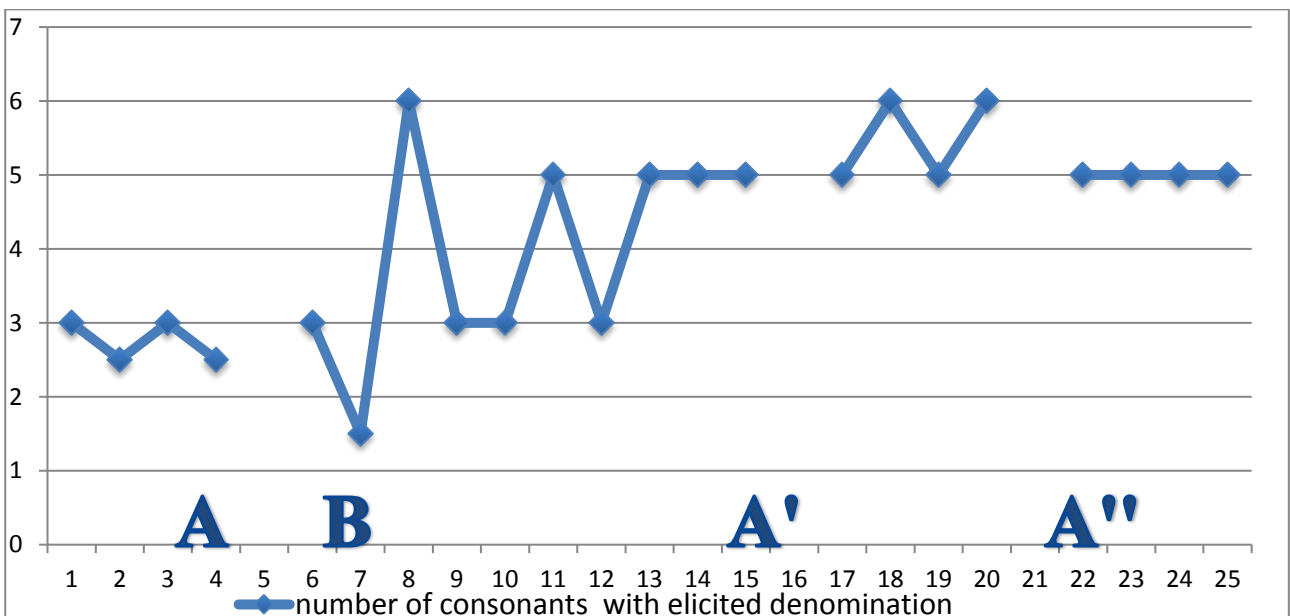
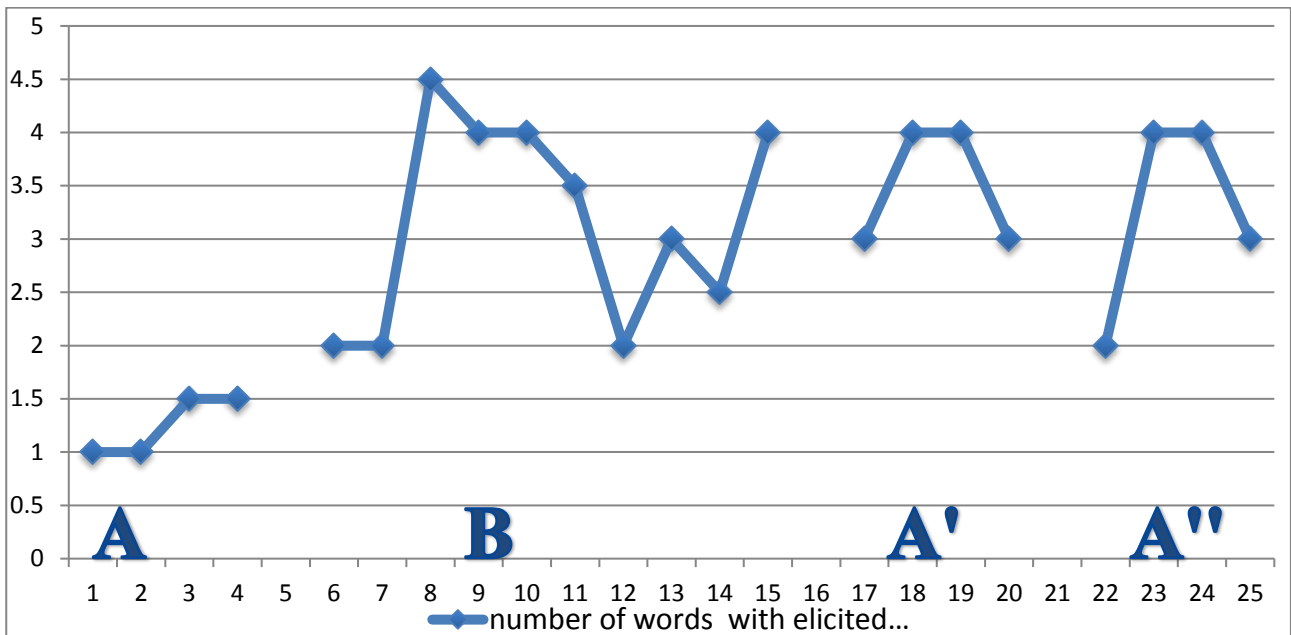
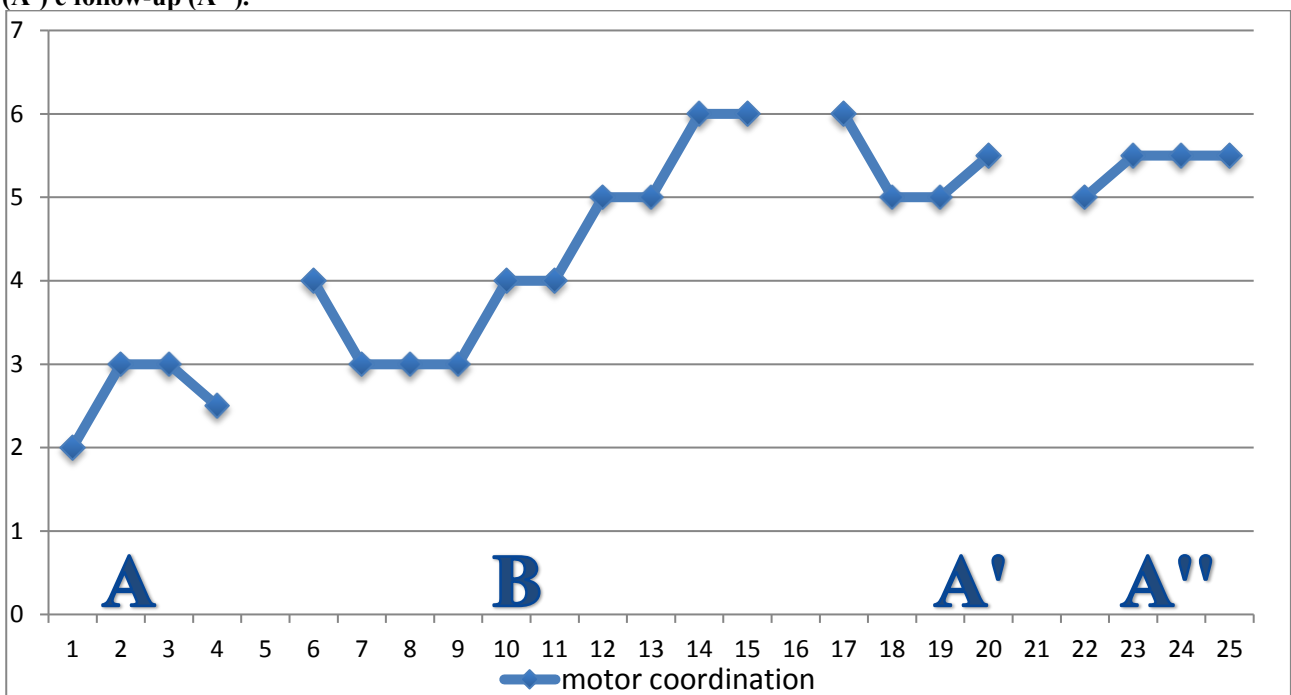


Figura 3. Numero di parole eliciate con denominazione relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').



Con riferimento all'andamento relativo ai parametri del coordinamento motorio, presentati in figura 4, il test C ha fornito il valore, $Z(18) = 2.89$, $p < 0.05$. Il trend ha dimostrato un notevole aumento confermando che il trattamento ha migliorato le capacità della ragazza nel coordinamento fine della mano durante un compito di discriminazione.

Figura 4. Andamento delle abilità di coordinazione motoria relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').



Le differenze tra le quattro fasi, pre-test (A), training (B), post-test (A') e fasi di follow-up (A''), sono state valutate mediante l'analisi dei ranghi di correlazione (ρ) di Spearman che evidenzia sia nella fase di post-test e sia nel follow-up il mantenimento di un elevato livello di prestazioni.

Infine, l'analisi EEG quantitativa (QEEG), effettuata su ogni canale di registrazione ha dimostrato un incremento globale degli spettri di potenza e frequenza banda dei ritmi elettroencefalografici, come si evince nella tabella 4. Per quanto riguarda il ritmo theta, registrato sulle aree prefrontali e frontali dei due emisferi, è stato registrato un significativo incremento degli spettri di potenza banda passando da valori patologici di 4.7 Hz nel pre-test a valori ai limiti della norma nel post tdc**7.3**e nel follow-up**7.2**(fig.5) Inoltre la QEEG ha mostrato un decremento nella frequenza di comparsa del ritmo theta, sostituito da ritmi più rapidi quali alpha a 9 c/sec e beta a 14 c/sec (fig.6). Lo studio neurofisiologico ha inoltre mostrato un significativo incremento nelle potenze del ritmo beta registrato sulle aree cerebrali frontali temporali e parietali passando da valori di **14.2** nel pretest, **19.4** nel post-test, così come evidenzia l'analisi degli spettri di potenza banda in figura (Fig. 7,8).Per quanto concerne il ritmo alpha nelle regioni occipitali, la QEEG ha dimostrato un lieve incremento nelle potenze, con i seguenti valori: **8.1** nel pretest, **8.6** nel post test e **8.5** nel follow-up.

In breve, i risultati ottenuti dalla valutazione neurofisiologica dimostrano un significativo incremento della frequenza e della potenza dei ritmi EEG e la riduzione fino alla scomparsa di attività lente di significato patologico.

Tabella 4. Analisi dei ritmi theta, alpha, beta relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

Rhythmic	Pre-test	Post-test	Follow-up
Theta	4.7 Hz	7.3 Hz	7.2 Hz
Beta	14.2 Hz	19.2 Hz	18.3 Hz
Alpha	8.1 Hz	8.6 Hz	8.5 Hz

Figura 5. Analisi del ritmo tetha relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

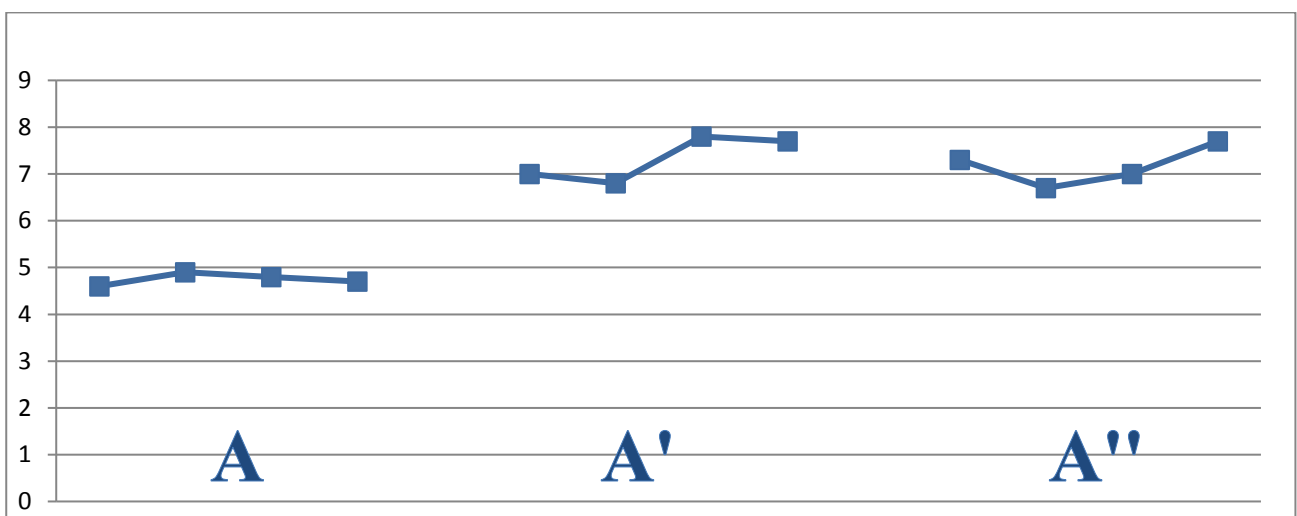


Figura 6. Analisi del ritmo alpha relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

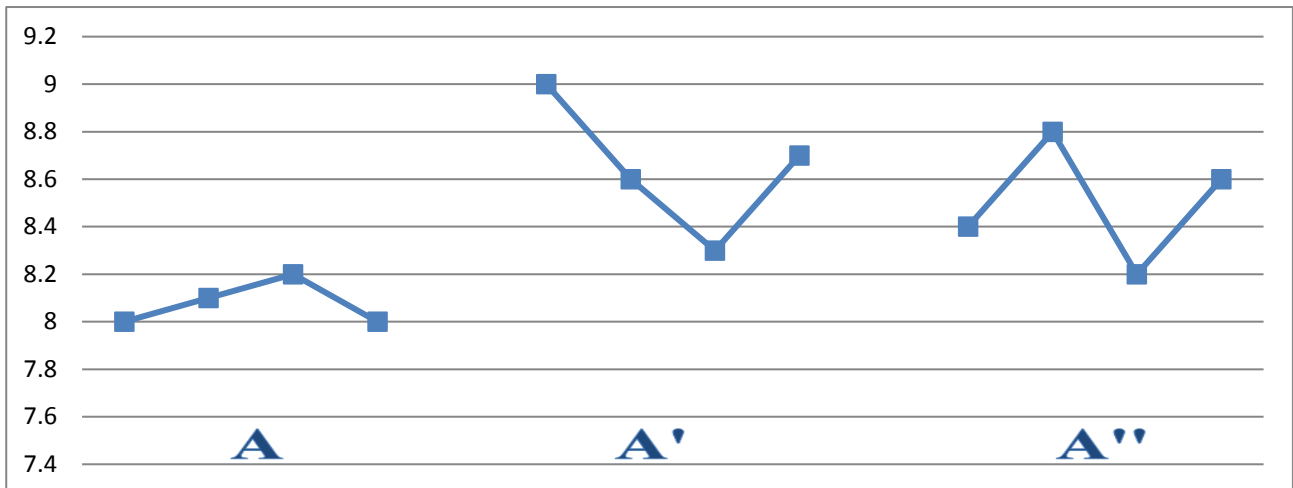


Figura 7. Analisi del ritmo beta relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'').

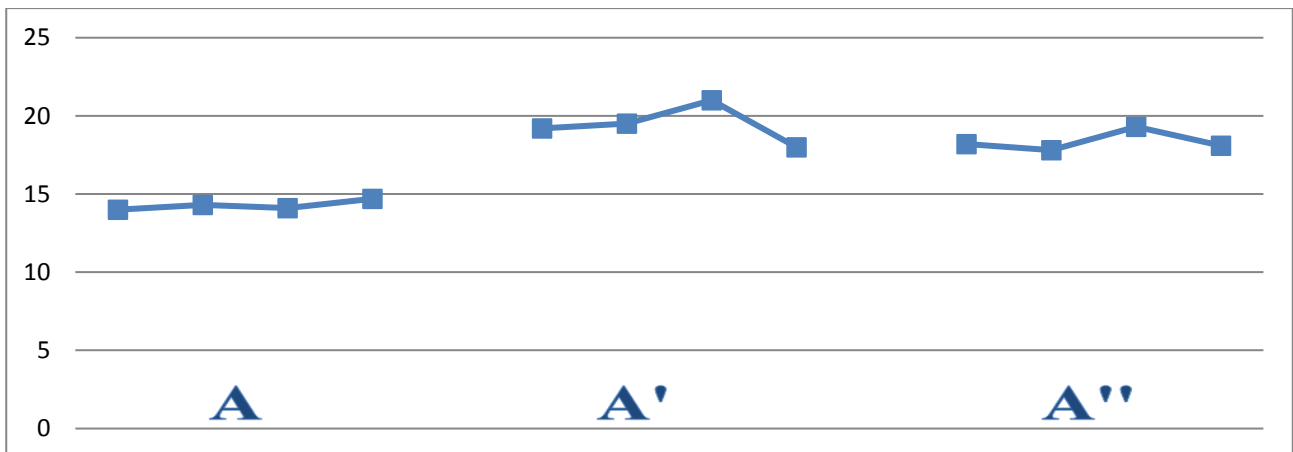
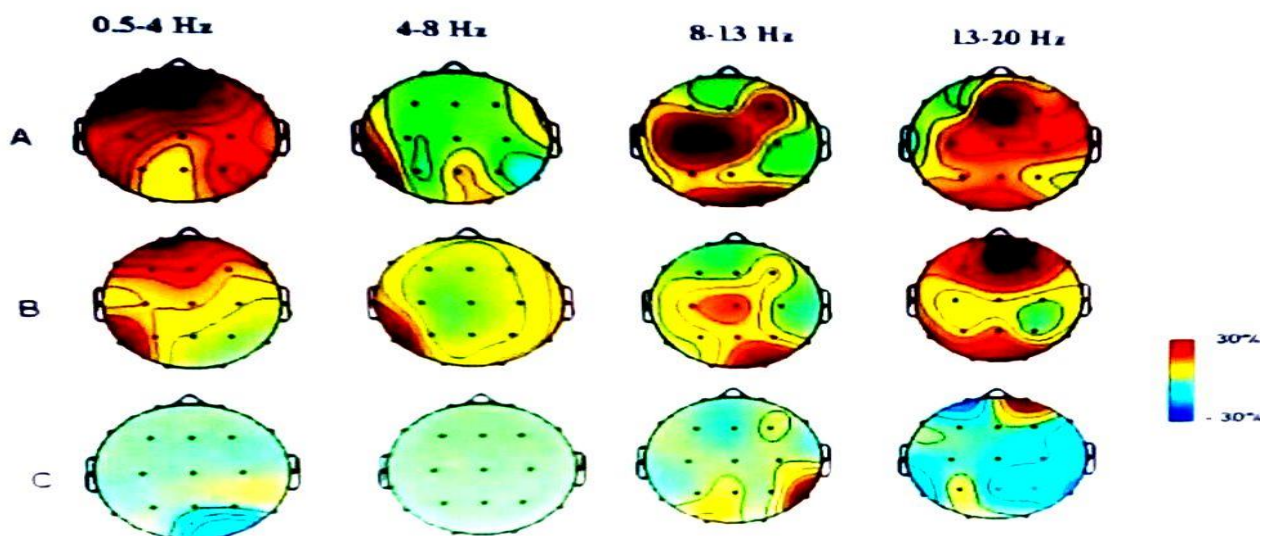


Figura 8 Aumento della coerenza cerebrale frontale dopo tDCS anodica



L'attivazione corticale, intesa come variazione indotta dalla tDCS, rispetto all'attività a riposo (in percentuale con segno positivo), è indicata con il colore rosso. In C si osserva la distribuzione dei ritmi EEG al T0, prima della sperimentazione, in A i correlati osservati immediatamente dopo la tDCS al T1 (a 10 giorni di distanza) e in B al T2 (nel follow-up, a un mese di distanza).

3.16 Discussione

In questa ricerca è stato presentato lo studio pilota su caso singolo di una ragazza affetta dalla sindrome RETT sottoposta a un trattamento combinato di tDCS e potenziamento cognitivo. Gli studi su caso singolo, sebbene sono considerati criticamente rispetto alle possibilità di generalizzazione dei risultati e dell'efficacia del trattamento, producono spesso dati preliminari che possono essere utili per futuri trattamenti applicati a un campione più vasto. Tuttavia i dati ottenuti nella ricerca mostrano un sensibile miglioramento generale delle performance linguistiche, delle capacità di apprendimento e della coordinazione motoria. Nello specifico, per quanto concerne le prestazioni linguistiche l'analisi statistica mostra un aumento nella produzione del numero di vocali parole e consonanti. Anche se i parametri raccolti durante la fase di training presentano la variabilità tipica delle prestazioni delle ragazze con RS (caratterizzate da un picco immediato e una successiva normalizzazione), l'analisi di correlazione di Spearman, che permette di confrontare pre-test (A), training (B), post-test (A') e fasi di follow-up (A''), mostra un aumento generale della produzione linguistica e un significativo miglioramento dei parametri di coordinazione motoria durante le diverse fasi della sperimentazione. Anche l'analisi EEG quantitativa correla con i dati cognitivo-comportamentali riportando un significativo incremento della potenza banda dei ritmi fisiologici (Alfa Beta Theta) sia nel sito di stimolazione che in aree cerebrali distanti.

Alla luce di questi risultati si può supporre che il trattamento combinato, potenziamento cognitivo applicato al linguaggio e tDCS, influenza in modo significativo una malattia cronica, anche se questa appartiene alle sindromi genetiche. Uno studio recente (Dan, Pelc, De Meirleri, e Cheron, 2015) ha messo in evidenza che la correlazione genotipo-fenotipo non è così rigida. Come ritenuto da molti autori, i fenotipi comportamentali possono essere influenzati da un gran numero di fattori legati non solo alla complessità dell'interazione genetica, ma anche dall'arricchimento degli stimoli ambientali, come proposto nel training di potenziamento cognitivo, impiegato nella presente ricerca. Inoltre, a sostegno dell'ipotesi che la combinazione tDCS e potenziamento cognitivo possa essere efficace nel potenziare alcune abilità deficitarie in una patologia cronica, ci sono dati provenienti da studi precedenti, i quali hanno dimostrato (Fabio, Castelli, Antonietti, e Marchetti, 2013) che il singolo intervento cognitivo sul linguaggio non si è mostrato efficace nelle bambine RETT. Dunque, i risultati della presente ricerca potrebbero fornire dati a sostegno del ruolo specifico della tDCS nel favorire la plasticità neuronale e in particolare nel potenziare la produzione e la comprensione di nuove parole in ragazze affette da questa sindrome. In conclusione, il presente studio dimostra che l'uso del metodo tDCS favorisce la plasticità cerebrale anche in una sindrome genetica cronica, ma stabile come la RTT. Tuttavia, anche se i case report sono spesso considerati di valore limitato nel comprendere alcuni aspetti di un disturbo del neuro-sviluppo, la presente ricerca offre l'opportunità di considerare alcuni dati preliminari al fine di comprendere quali siano le condizioni utili per applicare un trattamento combinato anche su gruppo più ampio di ragazze Rett.

PARTE TERZA SEZIONE SPERIMENTALE (STUDIO 2)

Studio sperimentale ed estensione dei risultati della ricerca sul rapporto
fra potenziamento cognitivo e tDCS nella sindrome di Rett

3.17 Obiettivi

Scopo di questa seconda fase della sperimentazione è quello di verificare gli effetti sulle funzioni cognitive linguistiche, sulle performance motorie e sui network cerebrali, indotte dalla tDCS combinata ad un training di potenziamento cognitivo su una casistica più ampia di ragazze affette dalla sindrome di Rett.

3.17.1 Partecipanti

Nel periodo compreso tra settembre e ottobre 2015 presso il Dipartimento di Neuropsichiatria infantile dell'ospedale Sant'Alessandro sito in Roma ha avuto inizio la sperimentazione su un campione di 11 soggetti sperimentali affetti da RS. Il campione è stato suddiviso in maniera random in due gruppi il primo è stato sottoposto alla tDCS anodica (AtDCS) e potenziamento cognitivo linguistico il secondo gruppo ha ricevuto la tDCS (SHAM placebo) ed il potenziamento cognitivo linguistico.

Alle pazienti di età compresa fra i 10 e 40 anni è stata fatta diagnosi di sindrome di Rett all'età di 20 mesi in base ai criteri clinici e diagnostici previste dalle linee guida internazionali. Tutti i soggetti sono stati classificati tra lo stadio clinico III e IV. Alcune ragazze erano in fase pseudo-stazionaria, mentre le altre erano in fase di stagnazione fin dall'inizio. L'assetto genetico delle ragazze è caratterizzato da una mutazione del gene MECP2. Tutti i partecipanti presentavano delle severe disfunzioni cognitive, linguistiche e motorie. Nello specifico le ragazze non erano in grado di utilizzare il linguaggio verbale, mentre a livello motorio presentavano movimenti stereotipati agli arti superiori tipici della sindrome.

La valutazione della sintomatologia attuale è stata eseguita attraverso l'utilizzo di strumenti standardizzati, che permettono un'analisi dei diversi profili di sviluppo neuropsicologici e attraverso la ricerca di sintomi specifici grazie all'osservazione diretta della ragazza.

3.17.2 Materiali e metodi

Tutta la procedura sperimentale (tabella 5) compresi i criteri di inclusione ed esclusione dallo studio e il disegno sperimentale sono gli stessi che abbiamo usato nello studio pilota .

Tabella 5. Strumenti di valutazione.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">✓ Vineland: misurazione del comportamento adattivo✓ R.A.R.S: intensità della gravità delle bambine con SR✓ Matrici di Raven (Modificate): test non-verbale sul QI✓ Test di Fanzago : valutazione articolazione fonetica✓ Valutazione Neurofisiologica (EEG quantitativo) |
|--|

3.18 Analisi esplorativa

L'analisi esplorativa evidenzia un trend in costante aumento nella produzione di nuove vocali consonanti e parole prodotte nel solo gruppo sperimentale così come rappresentato nei grafici (1-2-3). In riferimento ai parametri della coordinazione motoria il grafico 4 mostra altresì un miglioramento significativo nelle performance di discriminazione semantica oculo motoria (prova indice target) e nell'esecuzione di un compito complesso (prova di prensione e rilascio dello stimolo bersaglio su richiesta dello sperimentatore), un aspetto quest'ultimo che ci fa ipotizzare che la tDCS associata ad un training di potenziamento cognitivo oltre ad aver modificato la plasticità delle strutture corticali ha probabilmente determinato la riorganizzazione della citoarchitettura di strutture cortico sub-corticali quali i gangli della base che sappiamo costituire il sistema extrapiramidale la cui principale funzione è il controllo di azioni motorie complesse quali il movimento della mano e la stessa produzione fonetica.

Grafico n1. Numero di vocali elicitate con denominazione relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'') gruppo tDCS reale Vs gruppo placebo.

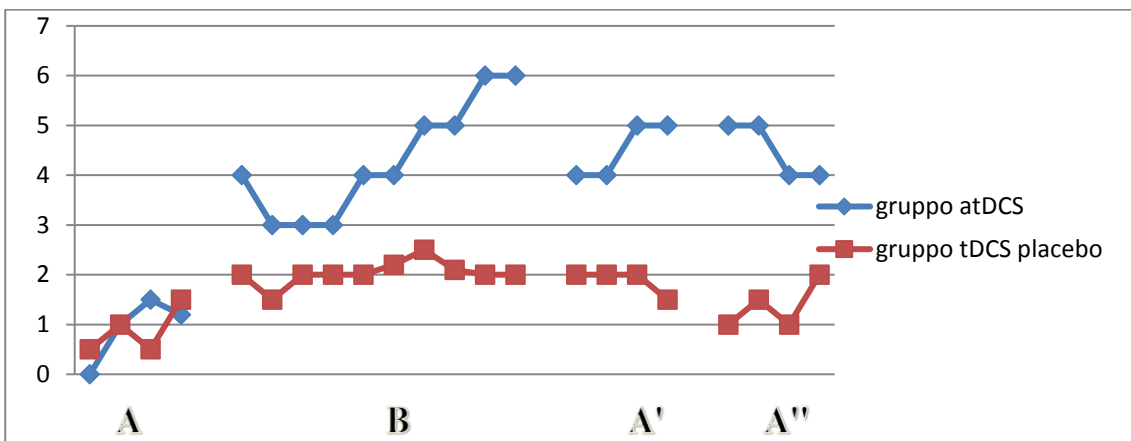


Grafico n2. Numero di consonanti elicitate con denominazione gruppo tDCS reale VS gruppo placebo.

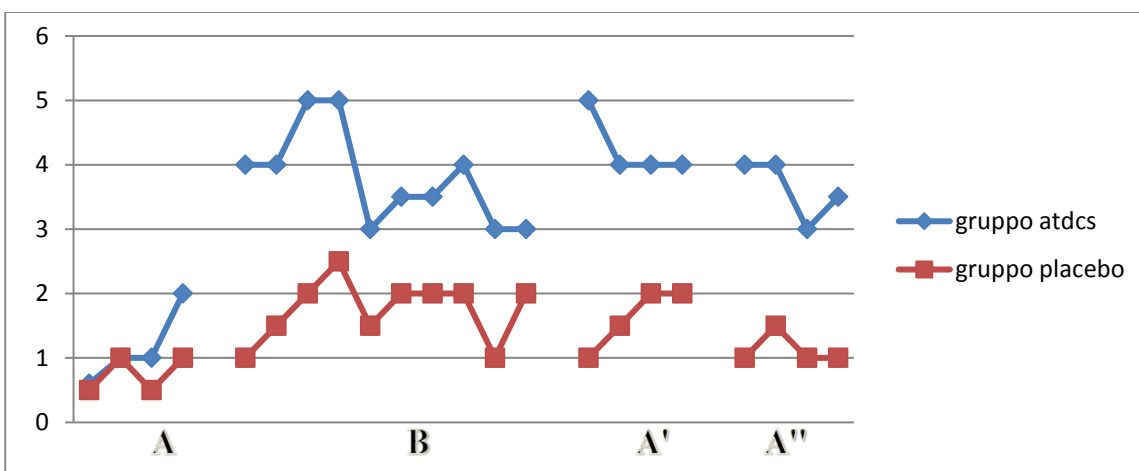


Grafico n.3 numero di parole eliciate con denominazione relative alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'') gruppoDCSrealeVSgruppo placebo.

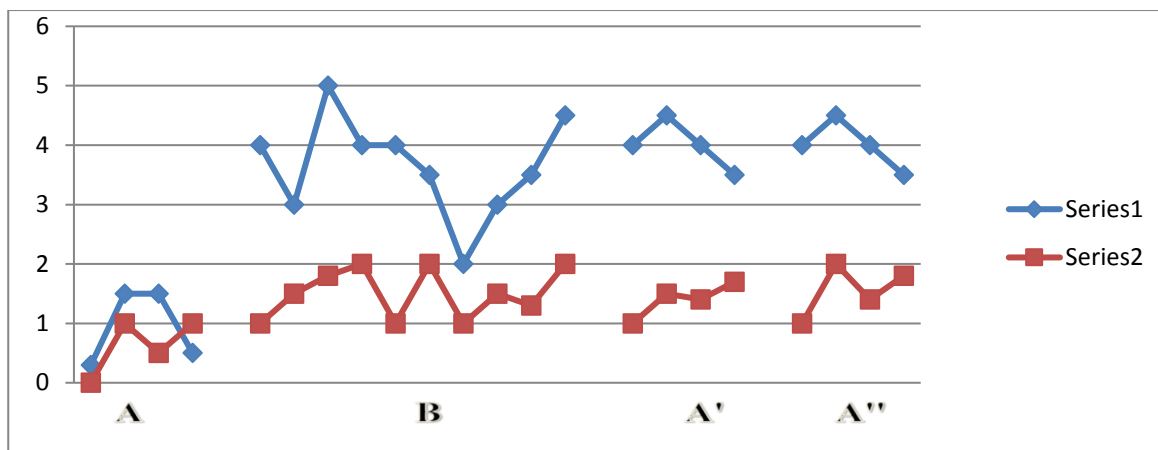
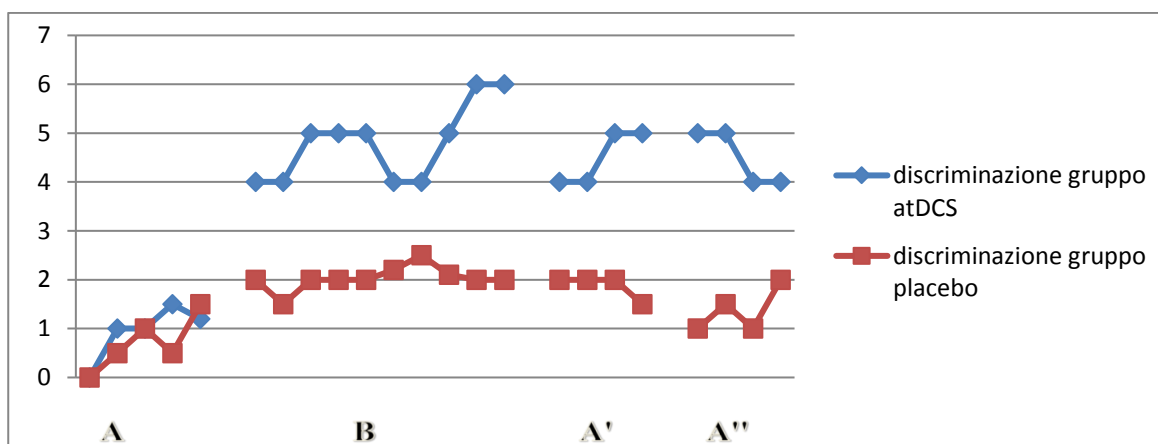


Grafico n. 4. andamento delle abilità di discriminazione motoria relativo alle fasi di pretest (A), training (B),post test (A') e follow-up (A'').



3.18.1 Analisi statistica dei risultati

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza ANOVA a misure ripetute 2 x 4 con una variabile between subject i due gruppi (sperimentale versus controllo) e le fasi (pre-test, training, post-test e follow-up). La variabile “gruppo” non presenta effetti significativi, $F(1,10) = 4,84$; $p < 0.08$, mentre la variabile relativa all’interazione gruppi x fasi presenta effetti significati, $F(3,27) = 19,21$; $p < 0.001$. Questo dato indica che in rapporto alle fasi i gruppi si comportano in maniera diversa, come si evince dalla figura 1, specificatamente il gruppo sperimentale mostra un netto miglioramento della prestazione, mentre il gruppo sottoposto a sham + potenziamento presenta un lieve decremento della prestazione.

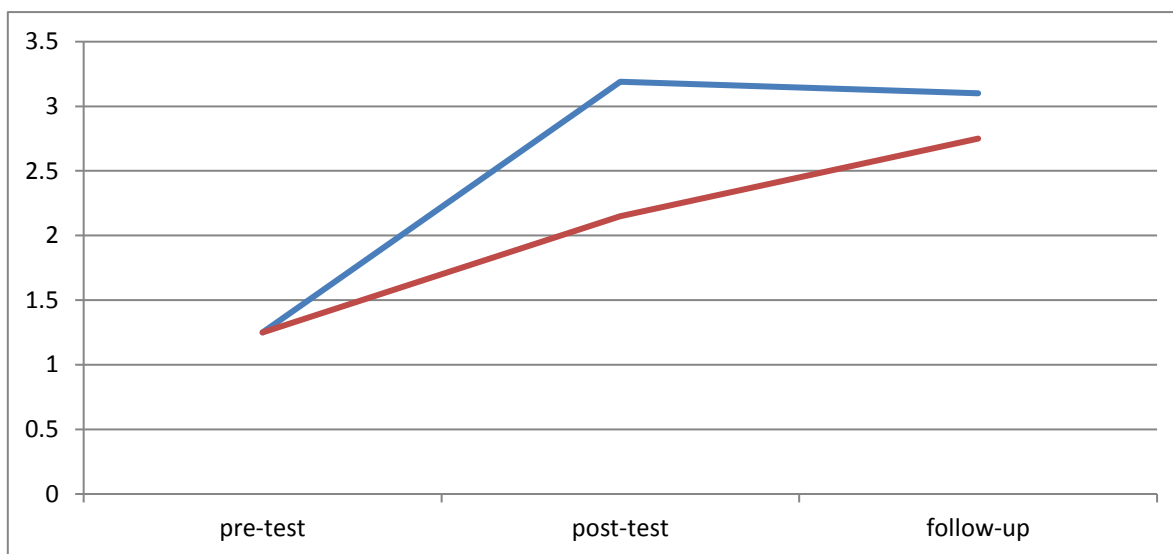
Produzione vocali

La tabella 1 presenta le medie e le deviazioni standard relative al paramentro “produzione di vocali”. Rispetto a questo paramentro, la variabile relativa all’interazione gruppi x fasi presenta effetti significati, $F(3,22) = 19,18$; $p < 0.001$. Come si evince dal grafico 5, questo dato indica che il gruppo sottoposto al training combinato rispetto al gruppo sottoposto a sham+potenziamento mostra una produzione maggiore nel numero di vocali; tale dato rimane stabile anche nelle misurazioni relative al post-test e nel follow-up.

Tabella 1. Medie e (deviazioni standard) relative alla produzione di vocali nelle tre fasi di valutazione

Gruppi	pre-test	post-test	follow-up
Sperimentale	1,25 (0,33)	3,19 (0,88)	3,1 (0,99)
Controllo	1,25 (0,00)	2,15 (0,00)	2,75 (0,00)

Grafico5. Andamento dei due gruppi rispetto alla produzione delle vocali nelle fasi di pre-test, post-test e follow up



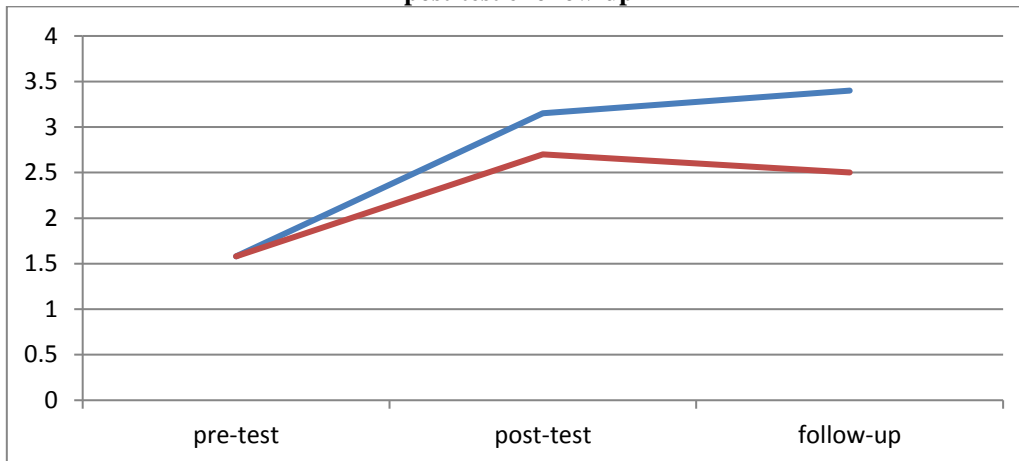
Produzione consonanti

La tabella 2 illustra le medie e le deviazioni standard relative al parametro della produzione di vocali. In riferimento a questo parametro, la variabile relativa all'interazione gruppi x fasi presenta effetti significati, $F(3,27) = 19,21$; $p < 0.001$. Come si evince dal grafico 6, questo dato indica che il gruppo sottoposto al training combinato rispetto al gruppo sottoposto a sham+potenziamento mostra la produzione di un numero maggiore di consonanti, tale dato rimane stabile anche nelle misurazioni post-test e nel follow-up.

Tabella 2. Medie e le deviazioni standard relative alla produzione di consonanti nelle tre fasi di valutazione

gruppi	pre-test	post-test	follow-up
sperimentale	1,58 (1,01)	3,15 (1,24)	3,4 (1,64)
controllo	1,58 (0)	2,7 (0)	2,5 (0)

Grafico 6. Andamento dei due gruppi rispetto alla produzione di consonanti nelle fasi di pre-test, post-test e follow-up



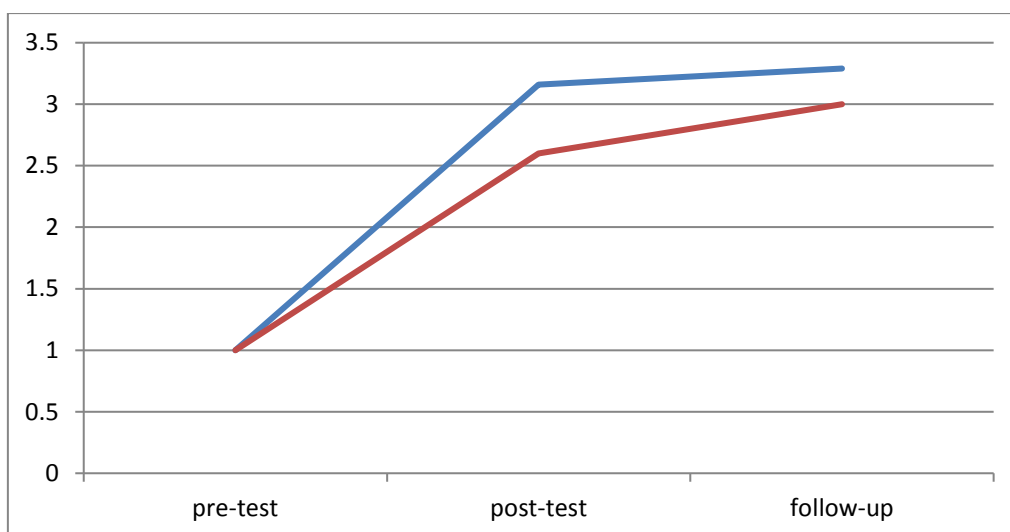
Produzione parole

La tabella 3 presenta le medie e le deviazioni standard relative al parametro produzione di vocali. In riferimento a questo parametro, la variabile relativa all'interazione gruppi x fasi presenta effetti significati, $F(3,26) = 2,95$, $p < 0.05$. Come si evince dal grafico 7, questo dato indica che il gruppo sottoposto al training combinato rispetto al gruppo sottoposto a sham+potenziamento mostra un numero maggiore di parole prodotte che rimane stabile anche nelle misurazioni post-test e follow-up.

Tabella 3. Medie e (deviazioni standard) relative alla produzione di parole nelle tre fasi di valutazione

Gruppi	pre-test	post-test	follow-up
sperimentale	1 (0,46)	3,16 (0,85)	3,29 (1,16)
controllo	1 (0)	2,6 (0)	3 (0)

Grafico7. Andamento dei due gruppi rispetto alla produzione di parole nelle fasi di pre-test, post-test e follow-up



3.18.2 Analisi dei dati EEG

I dati EEG sono stati campionati alla frequenza di 2048 Hz usando il software SystemPlus (Micromed, Treviso, Italy). L'amplificatore EEG era dotato di una risoluzione di 22 bits con un range di ± 25.6 mV per evitare la saturazione del segnale. Per quanto riguarda il filtraggio, è stato utilizzato un filtro hardware passa-banda anti-aliasing compreso tra 0.15 e 269.5 Hz. Le registrazioni EEG sono state ottenute tramite il calcolo della referenza media locale usando il software EEGLAB, strumento di Matlab (Delorme and Makeig, 2004). Sono stati applicati un filtro notch (50 Hz) ed una correzione della linea di base a tutti i canali, nonché un filtro passa-banda a 1-30 Hz mediante un filtro FIR (Finite Impulse Response). Le epoche EEG contenenti artefatti oculari, muscolari o di altra natura sono state identificate e successivamente eliminate. Furono selezionate tre condizioni per l'analisi offline, ogni canale è stato segmentato in epoche non sovrapposte della durata di 2 secondi ciascuna. Successivamente, è stata applicata una trasformata fast Fourier (FFT) ad ogni epoca, ciascuna contenente 2048 punti, con una risoluzione massima di 0.50 Hz e poi mediata alle altre epoche appartenenti alla stessa condizione (T0, T1 e T2). La densità dello spettro di potenza $P(f) \times (\mu V^2 / Hz)$ è stata stimata per tutte le frequenze comprese tra 0 e 50 Hz.

In tutti i pazienti del gruppo tDCS anodica reale è stato riscontrato un significativo incremento della potenza per quasi tutte le bande considerate (Beta, Alfa, Theta, Delta) (grafico 8) immediatamente dopo la stimolazione T1 a (10 giorni) e dopo tre mesi T2, ad eccezione delle aree occipitali dove la potenza banda del ritmo alfa si è mantenuta pressochè costante rispetto alla condizione basale. I dati EEG correlano dunque positivamente con i dati cognitivi e motori, così come dimostrato nella tabella 4, evidenziando nel breve e medio termine un significativo incremento degli spettri di potenza banda dei ritmi EEG fisiologici e la rispettiva riduzione della frequenza di comparsa dei principali ritmi patologici (theta e delta). In riferimento al gruppo di controllo (Gruppo Placebo) i dati EEG non evidenziano significative variazioni degli spettri di potenza banda rispetto alla condizione basale (tabella 5), dato quest'ultimo che correla con i risultati ottenuti nei test psicometrici e linguistici.

Tabella 4. Analisi EEG dei ritmi theta, alpha, beta relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up ((A') A'') gruppo sperimentale.

Rhythmic	Pre-test	Post-test	Follow-up(A')
Theta	6,1Hz	7,9 Hz	7.2 Hz
Beta	14,2Hz	21Hz	19.8 Hz
Alpha	8,6Hz	9Hz	8.8 Hz

Tabella 5. Analisi quantitative dei ritmi theta, alpha, beta relativa alle fasi di pretest (A), training B post test (A') e follow-up ((A') A'') gruppo di controllo.

Rhythmic	Pre-test	Post-test	Follow-up(A')
Theta	6,3Hz	6,5 Hz	6.2 Hz
Beta	13,9Hz	14,1Hz	13.6 Hz
Alpha	8,3Hz	8Hz	8 Hz

3.19 Discussione

I dati di questa ricerca su un campione di 11 ragazze affette da sindrome di Rett evidenziano un trend di costante incremento sia del numero di vocali, sia delle parole e delle consonanti prodotte durante tutta la sperimentazione. Tali dati inoltre si mantengono costanti anche nel post test eseguito a 10 giorni e nel successivo follow-up a tre mesi di distanza.

In riferimento ai parametri della coordinazione motoria i risultati mostrano altresì un significativo miglioramento delle performance di coordinazione oculo-motoria (prova indice target) e di esecuzione di un compito complesso (prova di prensione e rilascio dello stimolo bersaglio su richiesta dello sperimentatore). I parametri neurofisiologici correlano con i dati cognitivo-linguistici evidenziando variazioni significative degli spettri di potenza banda esaminati.

I risultati del presente studio suggeriscono che l'effetto terapeutico della tDCS nella sindrome di Rett potrebbe essere associato al ripristino dell'attività ritmica dei neuroni sottoposti alla stimolazione (area di Broca). Ipotizziamo inoltre un effetto a lungo raggio esercitato dalla metodica nel pacemaker talamico che ha avuto come conseguenza il potenziamento della connettività funzionale tra diverse regioni cortico-corticali (Kotchoubey et al., 2005; Sharova et al., 2007).

Facendo riferimento ai parametri della coordinazione motoria, ipotizziamo che l'effetto di diffusione della tDCS possa in qualche misura aver determinato il potenziamento della citoarchitettura fra strutture neuronali cortico sub-corticali quali i gangli della base che sappiamo essere indispensabili nella genesi di processi funzionali particolarmente complessi come le abilità motorie e il linguaggio articolato.

Parte quarta: disturbi del linguaggio acquisiti: l'afasia di Broca.

4.Introduzione

Le nostre conoscenze sulle basi nervose del linguaggio derivano principalmente dallo studio delle alterazioni linguistiche, note anche come afasie. L'eziologia è spesso determinata da lesioni cerebrali circoscritte a lesioni vascolari o a traumi cranio-encefalici. Le prime ricerche sulle afasie hanno aperto la strada che ha condotto a numerose scoperte sulle basi neurali dell'elaborazione del linguaggio. In primo luogo hanno evidenziato che nella maggioranza degli individui il linguaggio dipende in larga misura dall'emisfero sinistro. In particolare circa il 90% degli individui dipende dall'emisfero sinistro per quello che attiene l'elaborazione del linguaggio rispetto alla grammatica, al lessico, alla capacità di raggruppare fonemi diversi e all'emissione della parola. In secondo luogo, i primi studi sulle afasie hanno evidenziato che le lesioni che interessano le due principali aree corticali connesse con il linguaggio, la prima localizzata nella regione frontale laterale e la seconda nel lobo temporale posteriore superiore, determinano la comparsa delle afasie clinicamente più diffuse e che tali afasie colpivano il linguaggio in modo del tutto diverso. Queste due aree corticali sono rispettivamente l'area di Broca e l'area di Wernicke. Tali osservazioni hanno permesso ai neurologi di mettere a punto un modello di linguaggio che è oggi noto come modello di Wernicke-Geschwind(1974). La versione iniziale di questo modello ipotizzava che le aree cerebrali di Wernicke e di Broca svolgessero il compito rispettivamente, di analizzare le immagini acustiche delle parole e di articularle foneticamente. In secondo luogo si riteneva che il fascicolo arcuato fosse una via unidirezionale che trasportava le informazioni dall'area di Wernicke e quella di Broca.

Questo modello generale ha costituito la base di un'utile classificazione delle afasie ed ha rappresentato lo schema di fondo dal quale sono partite tutte le successive ricerche sulle basi neurali del linguaggio. Tuttavia, studi sugli effetti delle lesioni e ricerche di psicologia sperimentale hanno dimostrato che questo modello generale presenta notevoli limitazioni. In particolare, sono stati fatti molti progressi nella definizione delle aree per l'esecuzione di compiti linguistici dopo l'avvento di nuove tecnologie, fra le quali la tomografia ad emissione di positroni (PET), la risonanza magnetica funzionale (fMRI) e la registrazione dei potenziali evocati. Dai risultati di queste ricerche è emerso che il ruolo delle aree di Wernicke e di Broca non è così definito così come dimostravano i primi studi. Analogamente, sappiamo oggi che il fascicolo arcuato è un sistema bidirezionale che mette in comunicazione estese parti delle corteccie sensitive con le corteccie prefrontale e premotoria. Infine, si è osservato che anche diverse altre regioni dell'emisfero cerebrale sinistro, sia corticali sia sottocorticali, hanno un'importanza critica nell'elaborazione del linguaggio. Lo schema moderno che emerge da queste ricerche suggerisce che vi siano tre vasti sistemi che interagiscono strettamente nella percezione e nell'emissione del linguaggio. Uno di questi sistemi è formato dalle aree del linguaggio di Broca e Wernicke, da regioni circoscritte della corteccia dell'insula e dai nuclei della base. Prese nel loro insieme, tali regioni costituiscono il sistema di implementazione del linguaggio. Il sistema analizza i segnali uditivi afferenti in modo da attivare la loro conoscenza concettuale e provvede altresì alla costruzione dei fonemi, delle forme grammaticali nonché al controllo dell'articolazione delle parole. Il sistema di implementazione è circondato da un secondo sistema, il sistema di mediazione, composto da

numerose regioni distinte localizzate nelle corteccie associative dei lobi temporale, parietale e frontale. Le regioni del sistema di mediazione agiscono come una specie di “agente per conto terzi” fra il sistema di implementazione e un sistema concettuale, rappresentato da un gruppo di regioni distribuite nella parte restante delle corteccie associative d’ordine superiore, che sono di supporto alla conoscenza concettuale.

4.1 L’afasia di Broca

L’afasia di Broca è una sindrome causata da una lesione del giro frontale inferiore sinistro (che comprende le aree 44 e 45 di Brodmann), delle aree frontali attigue (superficie esterna dell’area 6 e aree 8, 9, 10 e 46 di Brodmann), della sostanza bianca sotto corticale, del lobo dell’insula e dei gangli basali. Il paziente esperisce difficoltà nell’articolazione fonetica, esperisce una marcata lentezza e non presenta le normali inflessioni del linguaggio. Un altro sintomo importante dell’afasia di Broca è l’incapacità di ripetere frasi complesse pronunciate dall’esaminatore e di denominare eventuali oggetti o immagini .

Recenti ricerche di neurolinguistica (ElHachoui, Lingsma, van de Sandt-Koenderman, Dippel, Koudstaal, & Visch-Brink, Vandenborrea, 2013; Vandenborrea, Visch-Brink & Mariëna, 2015) evidenziano che i pazienti affetti da questa sindrome riescono a comprendere frasi il cui significato si può desumere dal contenuto delle singole parole e dalle conoscenze pregresse, mentre presentano notevoli difficoltà a comprendere, frasi il cui significato dipende da una regola grammaticale, il che dimostra che la loro afasia non è un semplice difetto di emissione del linguaggio ma comprende anche un deficit dell’analisi. Da quanto detto si potrebbe dunque pensare che l’area di Broca sia il centro della grammatica, ma in realtà il linguaggio di questi pazienti non è del tutto privo di strutture grammaticali. Le persone affette da afasia di Broca sono talvolta in grado di compiere analisi grammaticali sottili e di distinguere frasi grammaticalmente corrette da altre che non lo sono, come nelle frasi seguenti:

- Marco fu infine baciato da Laura
- Marco fu infine baciato Laura

Affinchè una frase sia grammaticalmente corretta, sono necessari alcuni morfemi, ovvero delle componenti più piccole di una parola. La capacità dei pazienti di riconoscere che una frase necessita l’impiego di questi morfemi, insieme alla loro incapacità di analizzare i morfemi stessi per la comprensione di frasi complesse, è stata chiamata paradosso della “syntax-there-but-not-there” (Halpern, 1991). La soluzione possibile a tale quesito risiede nel fatto che una delle principali difficoltà sintattiche cui vanno incontro i pazienti affetti da afasia di Broca è quella di legare insieme elementi localizzati in parti diverse della frase e che debbono venir riferiti alla stessa entità (anafora e riempimento di un vuoto sintattico) (Abel, Shultz, Radermacher, Willmes, & Huber, 2005). Non riescono cioè a stabilire che una frase è sgrammaticata se l’errore di grammatica proviene da un legame scorretto fra due elementi staccati di una frase. La capacità di legare insieme due elementi richiede che il primo dei due elementi possa essere mantenuto nella memoria finché non si incontra il secondo elemento e i due elementi possano venir collegati. Ciò fa ritenere che l’area di Broca e le regioni ad essa associate prendano parte alla memoria verbale a breve termine necessaria per la comprensione della frase. Studi recenti di neuroimaging funzionale eseguiti con la PET dimostrano che il livello di attivazione

tende ad aumentare in zone circoscritte dell'area di Broca quando un soggetto cerca di elaborare una frase in mezzo alla quale esiste un vuoto sintattico (Abel, Shultz, Radermacher, Willmes, & Huber, 2005). L'ipotesi che l'area di Broca abbia a che fare con la memoria operativa a breve termine è in accordo con altre osservazioni. Si ritiene che la memoria operativa possieda un circuito fonologico, rappresentato da un magazzino temporaneo di memoria relativa alle informazioni fonologiche, ed un processo di ripasso mediante il quale la memoria viene continuamente rigenerata e dal quale vengono inviati, ma non eseguiti, comandi ai muscoli dell'apparato vocale. L'area di Broca potrebbe prender parte al circuito di ripasso, il che appare in accordo con la funzione dell'area di Broca nell'articolazione delle parole.

4.2 L'afasia di Wernicke

L'afasia di Wernicke, è un disordine del linguaggio che consegue a lesioni delle aree posteriori della corteccia uditiva associativa primaria di sinistra (area 22 di Brodmann), anche se nelle forme più gravi vi è l'interessamento di strutture più anteriori quali il giro temporale medio e la sostanza bianca sottocorticale. I pazienti con afasia di Wernicke parlano con inflessione e velocità normali e senza alterazioni dell'articolazione fonetica (Wernicke, 1874). Il contenuto linguistico, tuttavia, è spesso intellegibile per via dei frequenti errori nella scelta delle parole e dei fonemi. Invertono spesso l'ordine dei singoli suoni e dei loro raggruppamenti e li aggiungono o li sottraggono alle singole parole in modo che lo schema corretto dei fonemi ne risulta totalmente alterato (parafasie fonemiche). Anche nei casi in cui i singoli suoni delle parole vengono formulati in modo corretto, i pazienti con afasia di Wernicke esperiscono difficoltà nella scelta delle parole che esprimono nella maniera migliore il significato di quanto vogliono dire (parafasia semantica o verbale). Questi pazienti capiscono inoltre con difficoltà i discorsi degli altri. Anche se questo sintomo è previsto dal modello di Wernicke-Geschwind (1974), l'area di Wernicke non viene più considerata come il centro della comprensione delle informazioni uditive. Secondo la concezione più recente, l'area di Wernicke viene considerata come un elaboratore di suoni in grado di associare suoni e concetti.

4.3 L'afasia di conduzione

La forma cronica dell'afasia di conduzione è determinata dalla lesione del giro temporale superiore e del lobo parietale inferiore (aree 39 e 40 di Brodmann). Tali lesioni danneggiano certamente le proiezioni a feedback e a feed-forward che mettono in connessione le cortecce temporale, parietale, insulare e frontale (Bernal & Ardila, 2009). Queste vie di connessione sembrano appartenere a un sistema necessario per accomunare fonemi diversi in parole e per coordinare l'articolazione linguistica.

I pazienti sono in grado di comprendere frasi semplici e di parlare in modo comprensibile ma, analogamente ai pazienti con afasia di Broca e Wernicke, non sanno ripetere a voce le frasi che sentono, non riescono a riunire in modo efficace i diversi fonemi delle parole e non sono capaci di denominare agevolmente ciò che appare in una immagine o gli oggetti reali che vengono loro mostrati (Catani & Mesluma, 2008).

4.4 Le afasie transcorticali

I pazienti affetti da afasia motoria transcorticale parlano in maniera impacciata ma sono in grado di ripetere frasi anche molto lunghe. Questo tipo di afasia è stato messo in relazione con lesioni che interessano l'area frontale dorsolaterale, che costituisce un lembo di corteccia associativa situata anteriormente e superiormente all'area di Broca. Si ritiene che la corteccia frontale dorsolaterale abbia importanza per indirizzare l'attenzione e per il mantenimento di talune facoltà esecutive di carattere superiore, ivi compresa la scelta delle parole. L'afasia transcorticale può anche insorgere in seguito a lesioni dell'area motoria supplementare sinistra, che è localizzata nella parte alta del lobo frontale. Secondo il modello classico di Wernicke-Geschwind (1974), questa afasia è causata dalla perdita delle connessioni fra le aree del linguaggio e quelle che danno inizio e controllano il linguaggio automatico quali i gangli basali; la facoltà di ripetere è conservata in quanto le connessioni con l'area di Wernicke restano intatte.

I pazienti affetti da afasia transcorticale sensitiva parlano in modo fluente ma hanno una ridotta comprensione linguistica e incontrano notevoli difficoltà nel denominare gli oggetti (Bruce & Edmundson, 2009). Quest'afasia differisce da quella di Wernicke allo stesso modo con cui l'afasia transcorticale motoria differisce da quella di Broca: la ripetizione delle parole è conservata. In effetti, i pazienti con afasia transcorticale sensitiva possono anche suggerire correzioni grammaticali di frasi che in realtà non capiscono e perfino ripetere parole straniere. Quest'afasia sembra perciò un deficit del ripasso semantico, mentre le capacità sintattiche e fonologiche appaiono relativamente conservate (Mason-Baughman & Wallace, 2009). L'afasia transcorticale sensitiva è, in generale, dovuta a lesioni circoscritte dell'area di giunzione fra i lobi temporale, parietale e occipitale, che connette le aree perisilviane del linguaggio con le regioni corticali che presiedono alla comprensione del significato delle parole.

4.5 Altre aree cerebrali coinvolte nel linguaggio

Nell'ultimo decennio le ricerche sulle afasie (Tesak & Code, 2008; Turkeltaub, Messing, Norise & Hamilton, 2011) hanno messo in evidenza la presenza di strutture cortico-sub-corticali correlate con il linguaggio e localizzate, per lo più, nella regione temporale sinistra. Ricerche recenti (Anglade, Thiel & Ansaldo, 2014) hanno messo in luce che lesioni della corteccia temporale sinistra (aree 21, 20 e 38 di Brodmann) determinano una notevole alterazione del linguaggio, che consiste nell'incapacità di ricordare i nomi e che non si accompagna ad altre difficoltà grammaticali, fonemiche o fonetiche. Se le lesioni sono limitate al polo temporale sinistro (area 38 di Brodmann), il paziente presenta difficoltà nel ricordare i nomi propri di determinati luoghi e persone, ma non nel ricordare quelli delle cose comuni (Turkeltaub, Coslett, Thomas, Faseyitan, Benson, Norise, et al., 2012). Quando le lesioni interessano invece il settore medio temporale sinistro (aree 21 e 20), i pazienti hanno difficoltà a ricordare sia i nomi propri che quelli comuni. Infine, una lesione localizzata nella regione infero temporale posteriore sinistro determina un deficit nel ricordo dei nomi di particolari tipi di oggetti, di certi strumenti o utensili, ma non dei nomi delle cose naturali o di particolari entità. Il ricordo dei vocaboli relativi ad azioni o a relazioni spaziali non viene compromesso. Queste osservazioni fanno ritenere che nella corteccia del lobo temporale sinistro abbiano sede sistemi

neurali che consentono l'accesso alle parole che specificano diverse categorie di oggetti ma non a quelle che specificano le azioni relative a quegli oggetti o il rapporto fra un certo oggetto ed altre entità. Un'altra area non compresa nel modello classico delle afasie è una regione circoscritta dell'insula, che è un lembo di corteccia nascosto in profondità agli emisferi cerebrali. Osservazioni recenti suggeriscono che quest'area abbia un ruolo importante nella pianificazione e nella coordinazione dei movimenti articolatori necessari per l'emissione delle parole (Turkeltaub, Messing, Norise, & Hanilton, 2011).

I pazienti portatori di una lesione di quest'area provano difficoltà a pronunciare i fonemi nel loro giusto ordine; questi soggetti emettono combinazioni di suoni abbastanza simili ma non identici alle parole che vogliono pronunciare. Anche la parte della corteccia frontale localizzata sulla superficie mesiale dell'emisfero sinistro, e che comprende sia l'area motrice supplementare che la regione anteriore del cingolo (area 24 di Brodmann), svolge un'importante funzione nell'inizio e nello sviluppo della produzione fonetica. Queste stesse aree hanno anche un'importante funzione nell'attenzione e nelle emozioni e sono in grado, pertanto, di influenzare molte facoltà mentali superiori. La lesione di queste aree non determina la comparsa di un'afasia vera e propria ma rende difficile l'inizio del discorso (acinesia) e può determinare anche l'assenza completa della parola (Turkeltaub, Messing, Norise, & Hanilton, 2011).

PARTE QUARTA SEZIONE SPERIMENTALE

Effetti della tDCS e del potenziamento del linguaggio
in pazienti affetti da afasia di Broca in fase cronica.

4.6 Obiettivi

Nelle sindromi afasiche un adeguato intervento riabilitativo, capace di cogliere prontamente le necessità del soggetto e di aiutarlo a gestire in maniera efficace le problematiche conseguenti questo evento risulta di vitale importanza, soprattutto se si considera che il paziente con afasia non ha perso la sua capacità comunicativa: è solo la componente linguistica a risultare compromessa (Perkins, 1998), mentre viene mantenuta l'abilità di formulare uno scopo, di interpretare le informazioni contestuali e di intuire le motivazioni e le aspettative degli interlocutori. Emerge quindi la necessità di un percorso riabilitativo in grado di aiutare il soggetto a comunicare più efficacemente con gli altri, sfruttando le abilità residue e tentando, per quanto possibile, di intervenire anche su quelle compromesse dalla lesione. Soprattutto in fase acuta, la maggior parte degli interventi di questo tipo vengono effettuati da terapisti del linguaggio, che valutano quali sono i bisogni e le necessità del paziente ed intervengono al fine di raggiungerli, utilizzando una combinazione di strumenti e tecniche tarate sul profilo del soggetto. Secondo Schlaug (2011) però una simile tipologia di riabilitazione, seppur in grado di facilitare e potenziare il ripristino di alcune componenti linguistiche nei primi mesi dall'evento non è sempre in grado di portare sempre ad un recupero completo, dal momento che il soggetto, anche dopo diversi mesi di terapia, può continuare ad esperire difficoltà significative nel processamento e nella comprensione del linguaggio (Szaflarsky et al., 2011). Nel caso in cui i tradizionali approcci a tale problematica risultino incompleti, diventa allora necessario utilizzare strategie complementari, capaci di potenziare l'effetto del training in atto (Kang, 2009). Negli ultimi anni sembra emergere sempre di più, di pari passo con l'avanzamento delle conoscenze e delle scoperte in ambito neuroscientifico, l'importanza di un approccio interdisciplinare a tale problematica, che combini differenti metodologie di intervento (Miniussi, 2008). In un simile contesto si inserisce bene l'utilizzo di strumenti di stimolazione cerebrale (Nitsche, 2008). In generale, lo scopo di queste tecniche è quello di potenziare l'eccitabilità neuronale nelle regioni corticali ipsilesionali e di diminuirle in quelle controlesionali (Yozbatiran, 2009). Nello specifico, negli ultimi anni soprattutto due metodi di stimolazione cerebrale non invasive sono stati utilizzati nei pazienti con lesione acquisita, la stimolazione transcranica a corrente diretta (tDCS) e la stimolazione magnetica transcranica (TMS). Il principio sottostante tutte queste procedure è quello della plasticità cerebrale. I fisiologici processi di recupero possono infatti essere potenziati e modificati attraverso un'adeguata stimolazione esterna, con tecniche in grado di indurre un cambiamento della connettività funzionale e strutturale (Nudo, 2011; Villamar et al., 2012). Ciononostante sono pochi gli studi presenti in letteratura dove si evidenzia un approccio mirato tDCS potenziamento del linguaggio in soggetti affetti da gravi forme di afasia cronicizzata.

Sulla base di queste premesse è stato progettato un protocollo sperimentale che prevede l'associazione di un training intensivo di tDCS anodica ad alta risoluzione temporale associata ad un paradigma di potenziamento

linguistico in un gruppo di 20 pazienti affetti da afasia non fluente post stroke non rispondenti ai comuni trattamenti logoterapici. L'obiettivo dello studio è quello di intervenire promuovendo i processi di sinaptogenesi cerebrale fondamentali per il recupero delle competenze linguistiche.

Gli effetti indotti dalla sperimentazione sulle funzioni linguistiche sono stati valutati con la somministrazione della batteria di valutazione dei disturbi afasici AACHENER APHASIE TEST (AAT) versione italiana (Wilmes, Luzzatti e De Bleser, 1996).

In riferimento allo studio sulla neuroplasticità sono stati utilizzati come parametri di misurazione i dati ottenuti dalle valutazioni neurolinguistiche e dalle registrazioni EEGrafiche .

4.6.1 Soggetti

Nel periodo compreso tra ottobre 2015 e giugno del 2016 è stato condotto uno studio caso controllo su un gruppo di 20 soggetti in prevalenza di sesso maschile affetti da afasia non fluente cronicizzata e durata media di malattia di 6.5 anni. Il livello scolastico è medio basso e il supporto familiare appare nella maggior parte dei casi buono.

La principale causa di afasia dei pazienti è legata a patologie di natura cerebro-vascolare e più specificatamente l'etiologia è determinata da una patologia ischemica così come dimostrato dall'imaging TAC e RMN. I deficit linguistici maggiormente rappresentati nel nostro campione sono disturbi di comprensione, espressione, l'agrammatismo, le anomalie, l'anosognosia e il gergo verbale.

A tutti i soggetti di età compresa tra i 62 e 74 anni è stata fatta diagnosi di afasia non fluente in base ai criteri clinici e diagnostici previste dalle linee guida internazionali.

La valutazione della sintomatologia attuale è stata eseguita con l'ausilio di strumenti standardizzati, che permettono un'analisi delle competenze linguistiche e attraverso la ricerca di sintomi specifici grazie all'osservazione diretta del soggetto.

Il campione è stato suddiviso in maniera random in due gruppi. Il primo è stato sottoposto a tDCS anodica reale in associazione al protocollo di potenziamento cognitivo linguistico; il secondo gruppo è stato sottoposto al potenziamento del linguaggio e stimolazione Sham.

L'arruolamento dei pazienti è stato condotto nel rispetto dei seguenti criteri di inclusione:

- Diagnosi di afasia di Broca cronicizzata accertata da centro specialistico.
- Presenza di lesione cerebrovascolare documentata da imaging TAC o RMN
- Diagnosi di malattia non inferiore a 6,5 anni
- Condizioni neurologiche stabili ;
- Presenza del modulo di consenso sottoscritto da persona legalmente autorizzata a tale atto, con allegata copia del provvedimento attestante l'autorizzazione.
- Approvazione da parte del comitato etico locale.

E dei seguenti criteri di esclusione:

- presenza di gravi alterazioni epilettogene all'elettroencefalogramma ;
- pregressi interventi neurochirurgici;
- presenza di pacemaker;
- presenza di farmaci condizionanti lo stato di coscienza vigilanza

4.6.2 Disegno sperimentale

In questo studio è stato impiegato un disegno sperimentale ABAA: fase di pre-test (A), training (B), post-test (A') e follow-up (A'').

4.6.3 Materiali e metodi

Sia nel pre-test che nel post-test a 10 giorni di distanza ed infine nel follow-up eseguito a tre mesi dall'inizio della sperimentazione i partecipanti sono stati sottoposti alla seguente valutazione neurolinguistica e neurofisiologica:

Linguaggio :batteria per la diagnosi dei deficit afasici AACHENER APHASIE TEST (AAT)

Si ispira al modello di Wernicke –Lichtheim modificato da Goodglass e gli autori riconoscono 4 sindromi afasiche standard (Broca, Wernicke, Globale ed Amnestica), oltre all'afasia di conduzione e alle afasie transcorticali considerate non standard. La batteria si propone di classificare i pazienti all'interno di una delle sindromi standard, descrivere il deficit nelle diverse modalità linguistiche e valutare la gravità del disturbo con un profilo che descriva separatamente la compromissione per le diverse modalità d'esame. Le prove sono composte da sottoprove atte ad analizzare all'interno di ciascuna modalità i diversi livelli in cui si articola il linguaggio: fonologico, lessicale-semantico e morfo-sintattico. I singoli item sono a loro volta disposti secondo un criterio di progressiva difficoltà linguistica allo scopo di differenziare disturbi di diversa gravità. L'esame prevede prove per la valutazione del linguaggio spontaneo, ripetizione, denominazione, lettura ad alta voce, dettato per composizione, dettato con scrittura a mano, comprensione orale di parole e frasi, comprensione scritta di parole e frasi. I punteggi ottenuti alle diverse prove dell'AAT possono essere analizzati mediante le procedure della diagnostica psicometrica per casi singoli; si può così calcolare per ogni paziente la probabilità di appartenenza ad una sindrome afasica. Il test, costruito su precisi criteri linguistici, è di semplice applicazione e la standardizzazione ha permesso di mettere a punto una metodica assai accurata ed attendibile per il confronto delle prestazioni tra diverse prove di uno stesso esame o tra diversi esami nel corso dell'evoluzione. Il tempo di somministrazione è relativamente contenuto, circa 90 minuti, ma a questo va aggiunta circa mezzora per la trascrizione del materiale e la correzione del test. Ciò rende l'AAT adatto, più che per un uso generalizzato in ambiente clinico, per quando si voglia avere maggiore obiettività nel confrontare gruppi di pazienti tra loro sia per seguire l'evoluzione nel tempo di un singolo paziente.

Valutazione Neurofisiologica

È stata eseguita mediante la registrazione elettroencefalografica utilizzando un amplificatore EEG digitale costituito da 32 canali di acquisizione .

Lo studio è stato effettuato in una camera insonorizzata posizionando sullo scalpo dei pazienti i comuni elettrodi di registrazione a coppetta d'argento clorurato mediante una cuffia precablata costituita da 19 elettrodi di registrazione.

Gli elettrodi sono stati posizionati utilizzando i criteri previsti dal sistema di misurazione internazionale 10/20, il riferimento è stato posizionato su FPz e la terra posteriormente ad Fz, come riportato da precedenti studi (Formaggio et al., 2008; Storti et al. 2012). Il segnale elettroencefalografico è stato acquisito con una frequenza di campionamento di 256 Hz e sottoposto ad un filtraggio passa banda tra 3-60 Hz, per eliminare le basse e le alte frequenze, e un filtro notch a 50 Hz per eliminare eventuali disturbi di rete.

La durata di registrazione è stata di 20 minuti ed è stata condotta in condizione di riposo psicosensoriale ad occhi chiusi ed intervallata a brevi periodi in cui venivano fatti aprire gli occhi al fine di valutare la reattività del ritmo alfa registrato dalle aree della corteccia occipitale. Da ciascun intervallo di registrazione sono state selezionate 4 epoche di tracciato della durata di 3 minuti ciascuna prive di artefatti da sottoporre ad analisi EEG quantitativa per valutare l'attività e la frequenza di picco EEG del ritmo beta e theta rispettivamente a livello dei canali fronto-centro-temporali .

4.7 Procedura sperimentale: protocollo (tDCS)

La stimolazione transcranica a correnti dirette con modalità anodica è stata somministrata ad un'intensità di 2 mA, per una durata di 20 minuti per dieci giorni consecutivi, tramite uno stimolatore connesso ad una coppia di elettrodi collegati ad uno stimolatore a corrente costante (tipo HDC stimulation dell'Azienda Omicron T) isolato dalla rete elettrica poiché dotato di alimentazione propria (batterie a basso voltaggio).

L'elettrodo attivo è stato collocato sulla regione dello scalpo corrispondente alla regione corticale dell'emisfero dominante responsabile del deficit (area motoria del linguaggio) individuata mediante i riferimenti del sistema internazionale 10-20 per l'elettroencefalografia; l'elettrodo di riferimento è stato applicato in sede cefalica controlaterale .

4.7.1 Protocollo di potenziamento del linguaggio

Il programma di stimolazione cognitivo linguistico è stato esplicito contemporaneamente alla tDCS, in due distinte fasi:

Fase 1: ripetizione di suoni, vocali, parole e frasi.

Fase 2: denominazione di immagini e scene appartenenti a diverse categorie.

La codifica delle risposte è avvenuta attribuendo il punteggio standard già previsto nella batteria e confrontando i risultati nel breve medio e lungo termine .

Risultati

4.8 Analisi esplorativa

Sono state studiate le performance di ogni singolo paziente sottoposto a stimolazione tDCS con modalità anodica della corteccia fronto-temporale di sinistra impegnato ogni giorno in compiti di denominazione e ripetizione di determinati item derivati dalla batteria per la valutazione dei deficit linguistici Aachener (AAT) e controllati nel post test a 10 giorni di distanza e nel successivo follow-up a 90 giorni.

Già da una prima analisi del campione sperimentale i dati nelle diverse fasi hanno evidenziato complessivamente il miglioramento di quasi tutte le performance prese in esame sia per quanto concerne la variabile denominazione sia per la ripetizione così come dimostrato nelle tabelle dal n. 1 al n. 9 e nelle rappresentazioni grafiche che vanno dal n. 1 al n 18 .

In riferimento al gruppo di controllo il trend si mantiene costante e non evidenzia variazioni significative rispetto alla condizione pre-test come presentato nella successiva analisi statistica.

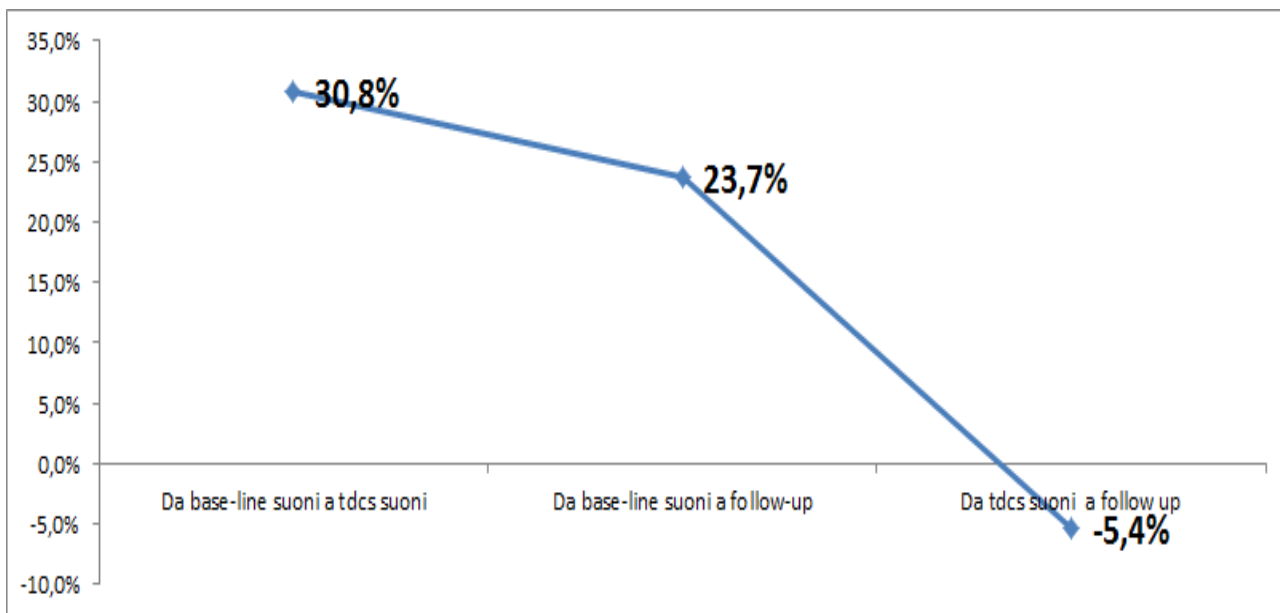
Tabella 1. Differenza nelle diverse fasi relativa al parametro suoni .

Soggetto	base-line suoni	Post-test	follow-up
1	15	27	24
2	29	30	30
3	20	27	25
4	30	30	26
5	30	30	30
6	12	25	27
7	8	28	24
8	30	30	30
9	7	19	15
10	30	30	30
	21,1	27,6	26,1

Grafico 1.differenza nelle diverse fasi relativa al parametro suoni .



Grafico2 .Scostamento nelle diverse fasi relativa al parametro suoni



Tab 2.differenza nelle diverse fasi relativa al parametro parole

Soggetto	parole base line	tdcs parole	follow up parole
1	16	28	27
2	20	26	26
3	5	19	20
4	26	29	27
5	26	30	30
6	6	16	21
7	3	8	8
8	29	30	30
9	9	21	23
10	14	28	27
	15,4	23,5	23,9

Grafico 3. Differenza nelle diverse fasi relativa al parametro parole

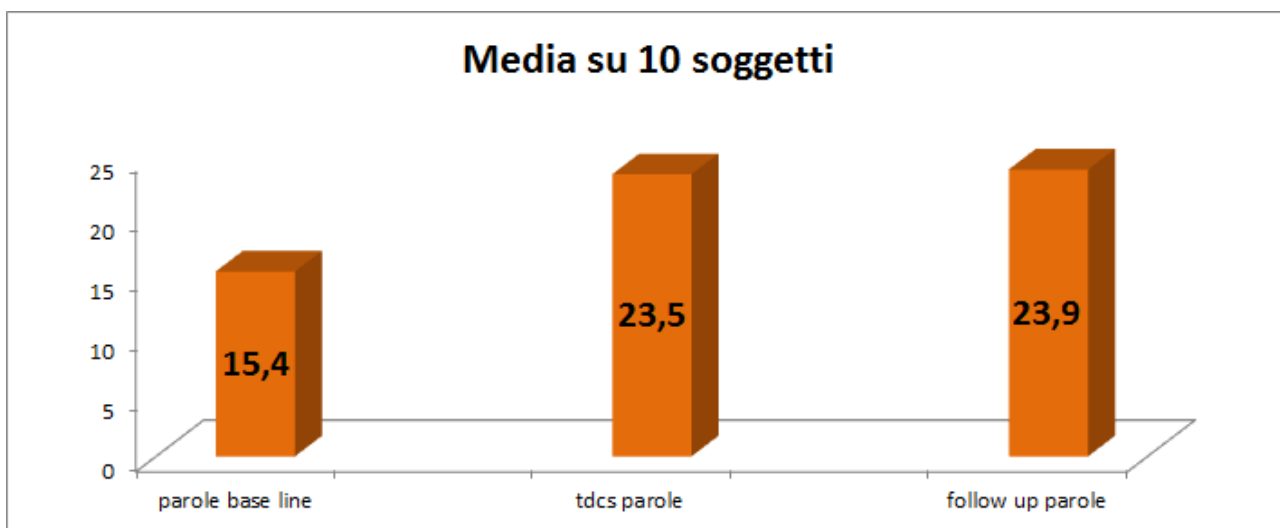
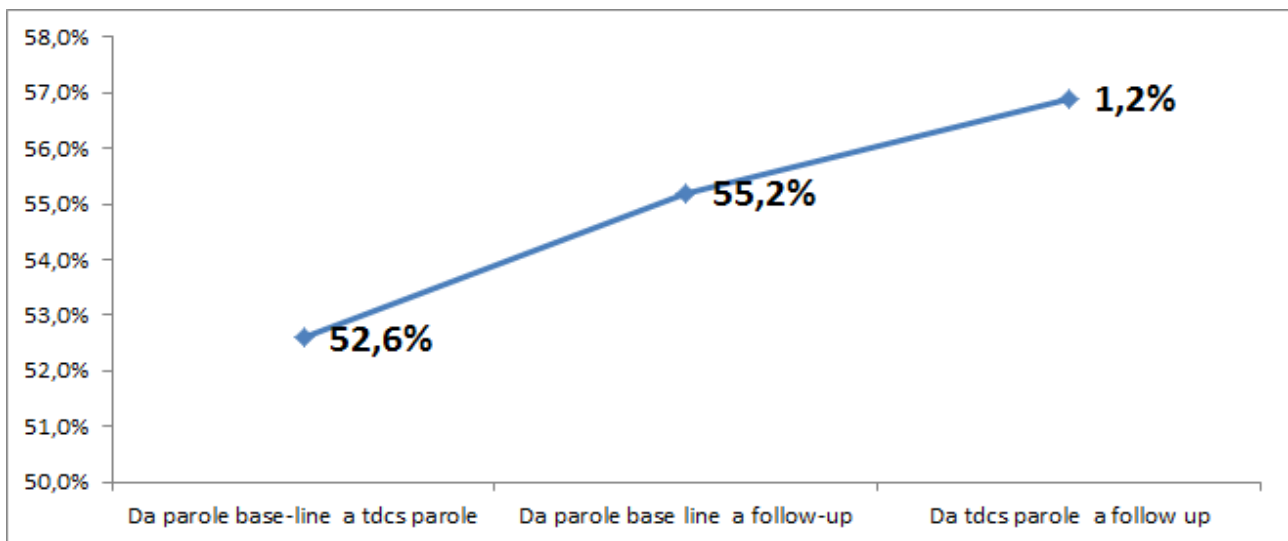


Grafico 4.Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro parole.



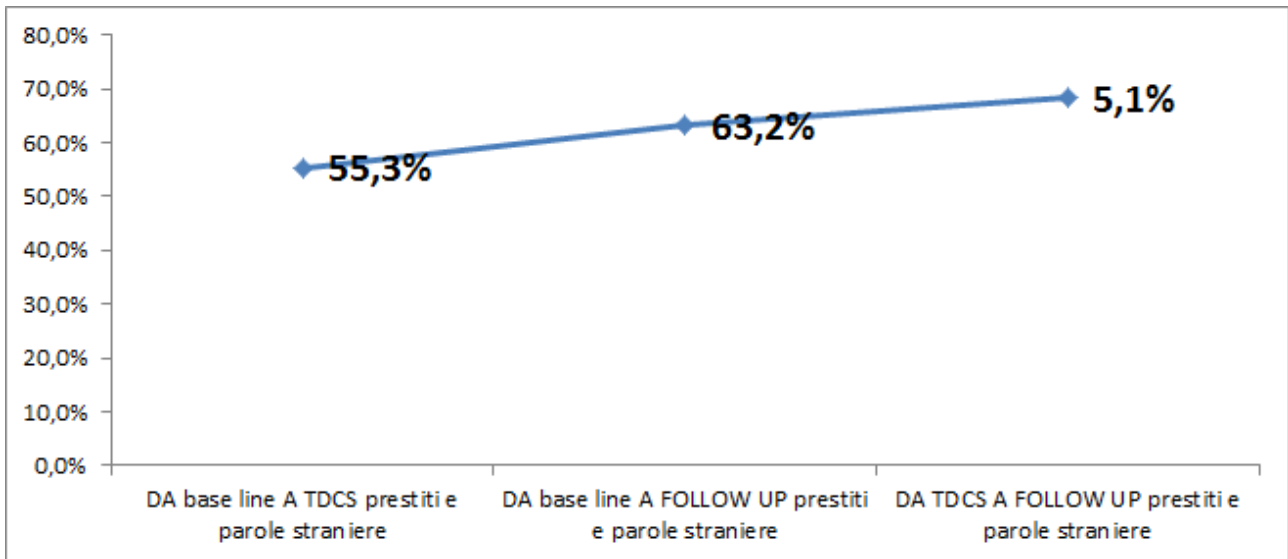
Tab.3 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro prestiti e parole straniere.

Soggetto	base line prestiti e parole straniere	tdcs prestiti e parole straniere	follow up prestiti e parole straniere
1	18	27	25
2	15	22	24
3	0	12	17
4	18	27	27
5	24	24	25
6	1	4	4
7	0	1	4
8	30	30	29
9	2	17	17
10	6	13	14
	11,4	17,7	18,6

Grafico 5.differenza nelle diverse fasi relativa al parametro prestiti e parole straniere.



Grafico 6. Scostamento percentuale relativo alle differenze nelle diverse fasi del parametro prestiti e parole straniere.



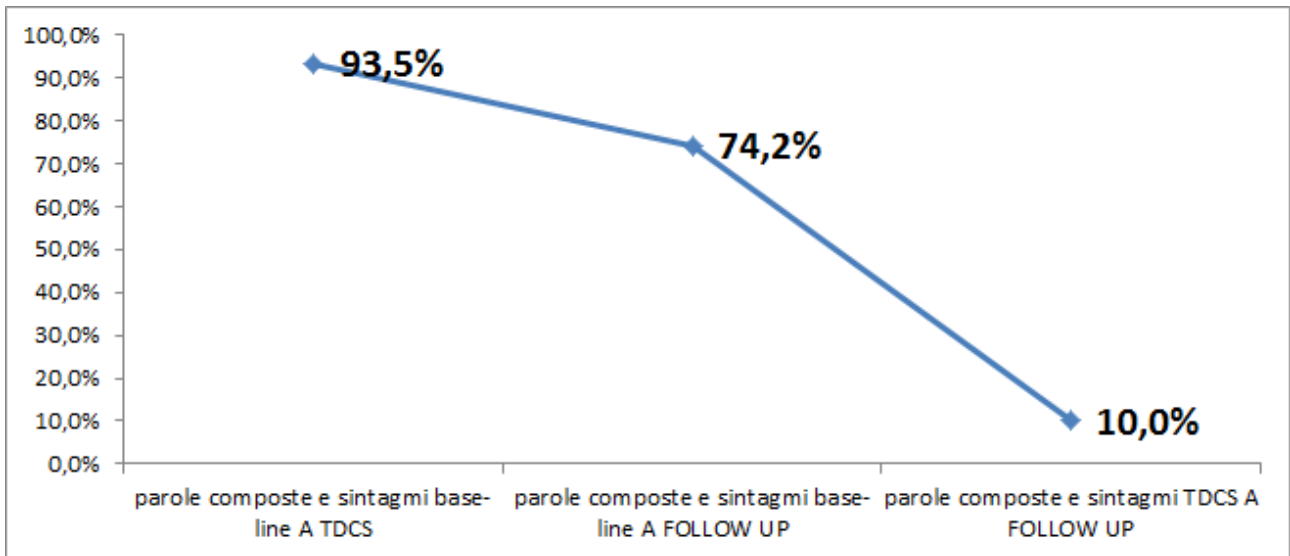
Tab.4 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro parole composte e sintagmi.

Soggetto	parole composte e sintagmi base-line	tdcs parole composte e sintagmi	follow up parole composte e sintagmi
1	4	23	21
2	6	16	13
3	0	8	6
4	6	13	13
5	11	12	11
6	0	2	3
7	0	0	0
8	25	28	24
9	4	6	5
10	6	12	12
	6,2	12	10,8

Grafico 7. Differenza nelle diverse fasi relativa al parametro parole composte e sintagmi.



Grafico 8.Scostamento percentuale relativo alla differenze nelle diverse fasi del parametro parole composte e sintagmi.



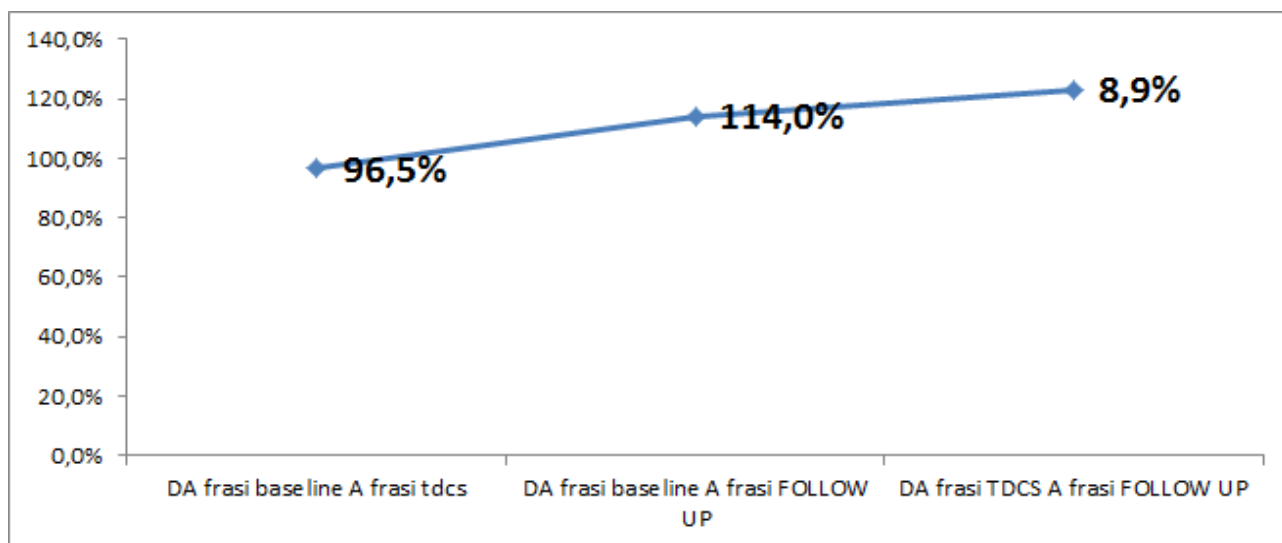
Tab.5 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro frasi.

Soggetto	frasi baseline	frasi tdc	frasi follow up
1	6	20	22
2	15	20	21
3	0	7	9
4	0	12	13
5	7	8	8
6	0	2	3
7	0	0	2
8	21	26	25
9	0	3	5
10	8	14	14
	5,7	11,2	12,2

Grafico 9. Differenze nelle diverse fasi relative al parametro frasi.



Grafico 10.Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro frasi.



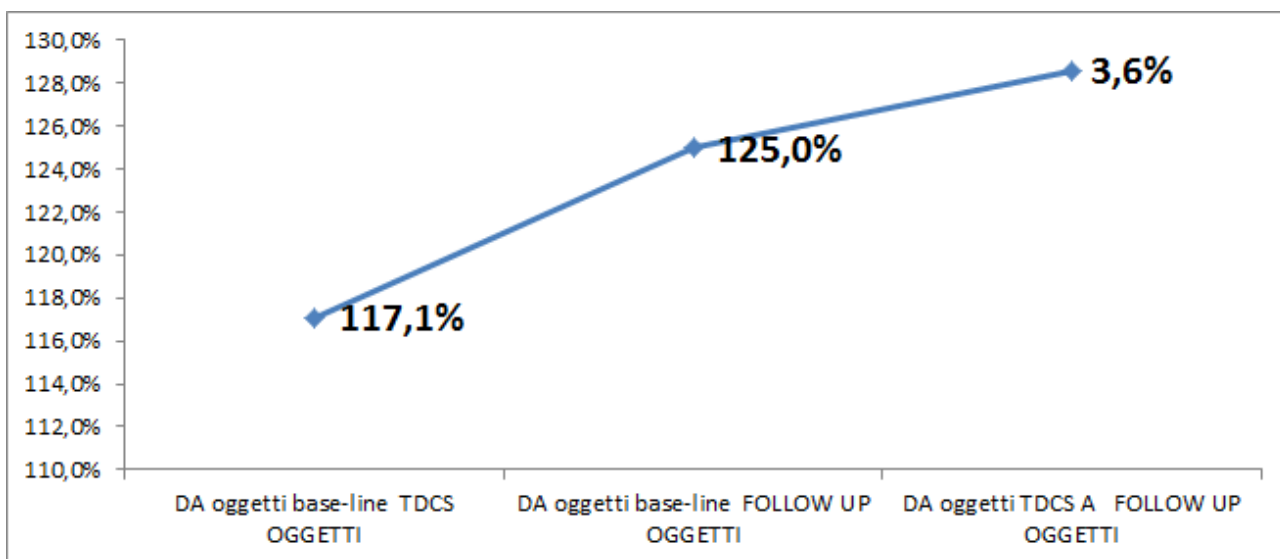
Tab.6 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro oggetti.

Soggetto	oggetti base-line	tdcs oggetti	follow up oggetti
1	12	29	25
2	14	19	24
3	2	15	17
4	10	19	19
5	18	19	19
6	0	5	5
7	0	0	1
8	8	22	21
9	1	15	20
10	11	22	20
	7,6	16,5	17,1

Grafico 11.Differenze nelle diverse fasi relative al parametro oggetti.



Grafico 12.Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro oggetti



Tab.7 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro colori.

Soggetto	colori base-line	colori tdc	colori follow up
1	9	28	26
2	12	19	20
3	0	18	17
4	14	14	17
5	5	6	7
6	0	5	5
7	1	1	2
8	28	29	28
9	3	3	4
10	14	12	13
	8,6	13,5	13,9

Grafico 13.Differenze nelle diverse fasi relative al parametro colori.

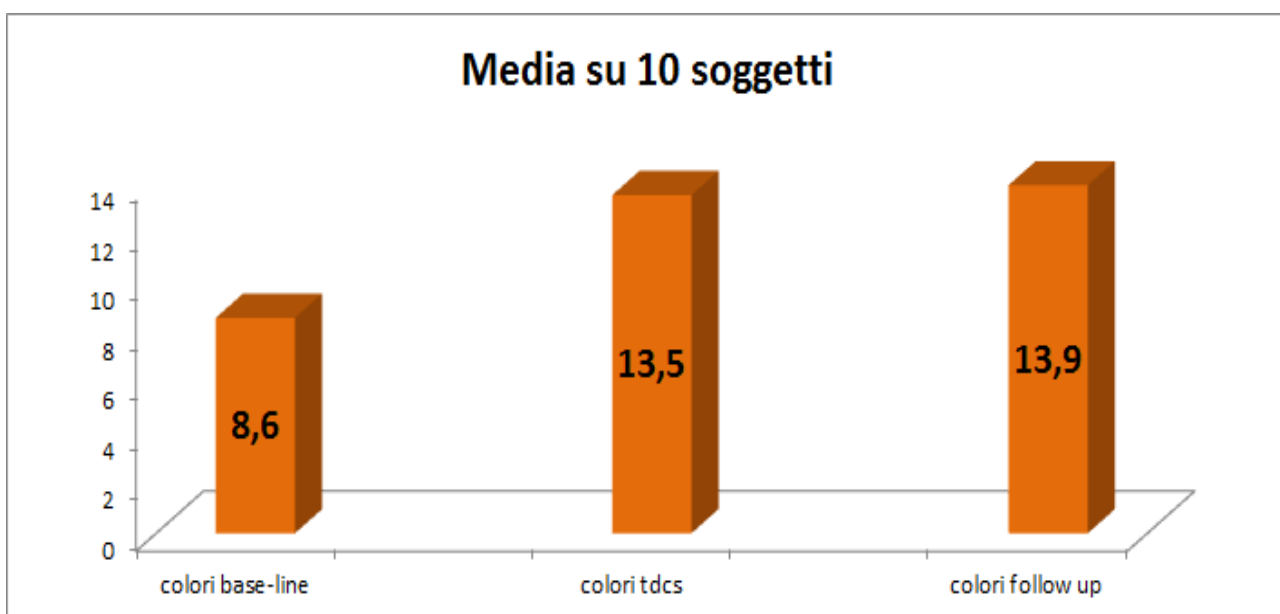
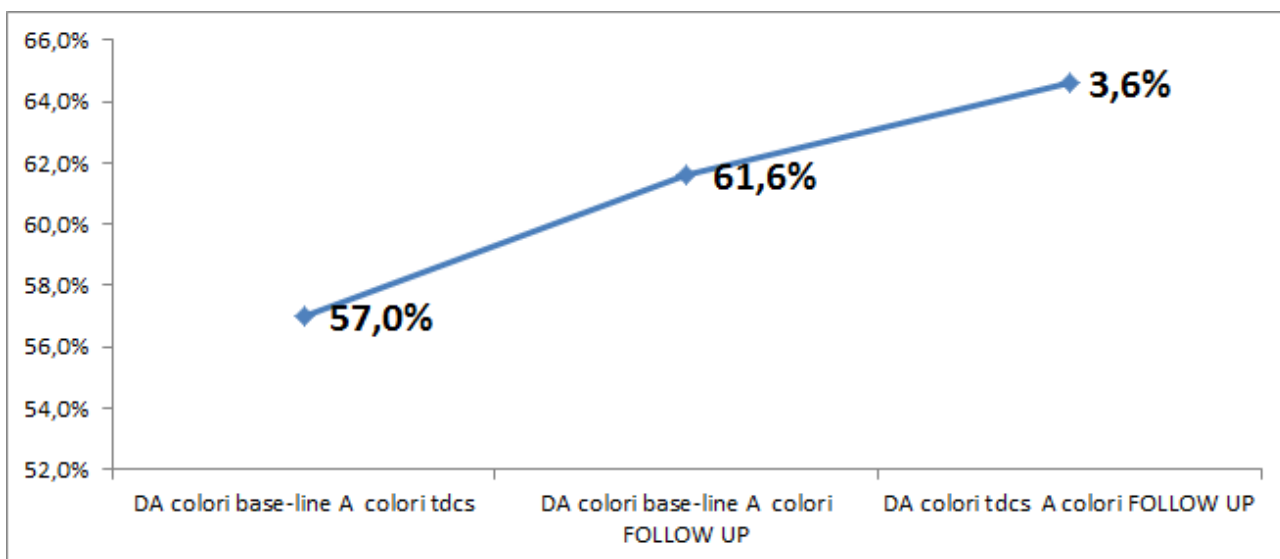


Grafico 14.Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro colori



Tab.8 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro nomi composti.

Soggetto	nomi composti base line	tdcs nomi composti	follow up nomi composti
1	8	25	25
2	3	9	12
3	0	21	20
4	2	27	27
5	16	16	18
6	0	4	4
7	0	0	1
8	28	29	29
9	3	7	7
10	8	20	20
	6,8	15,8	16,3

Grafico 15.Differenze nelle diverse fasi relative al parametro nomi composti.

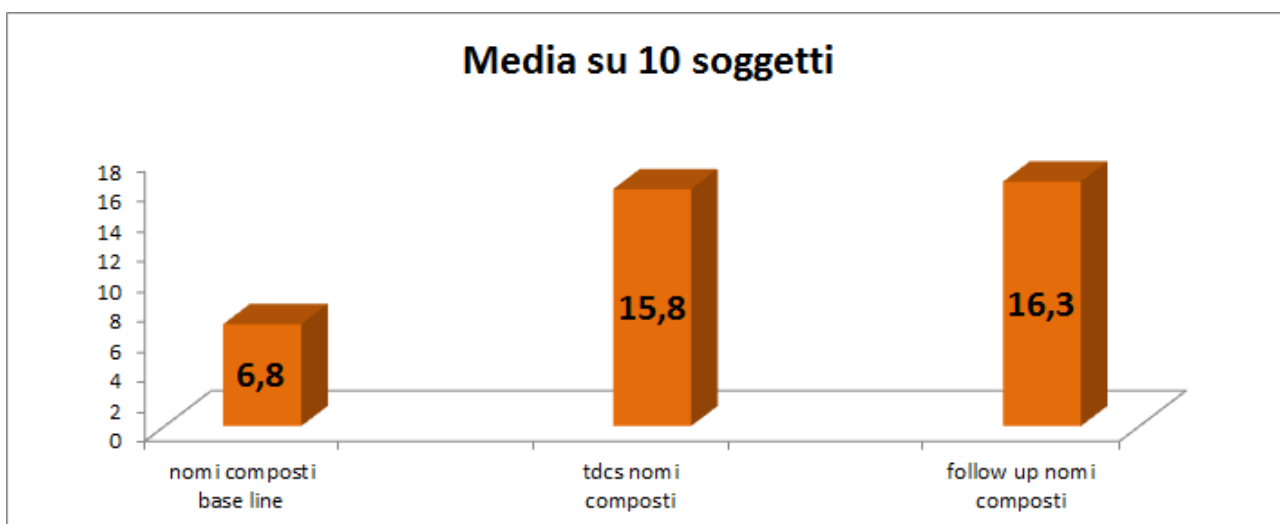
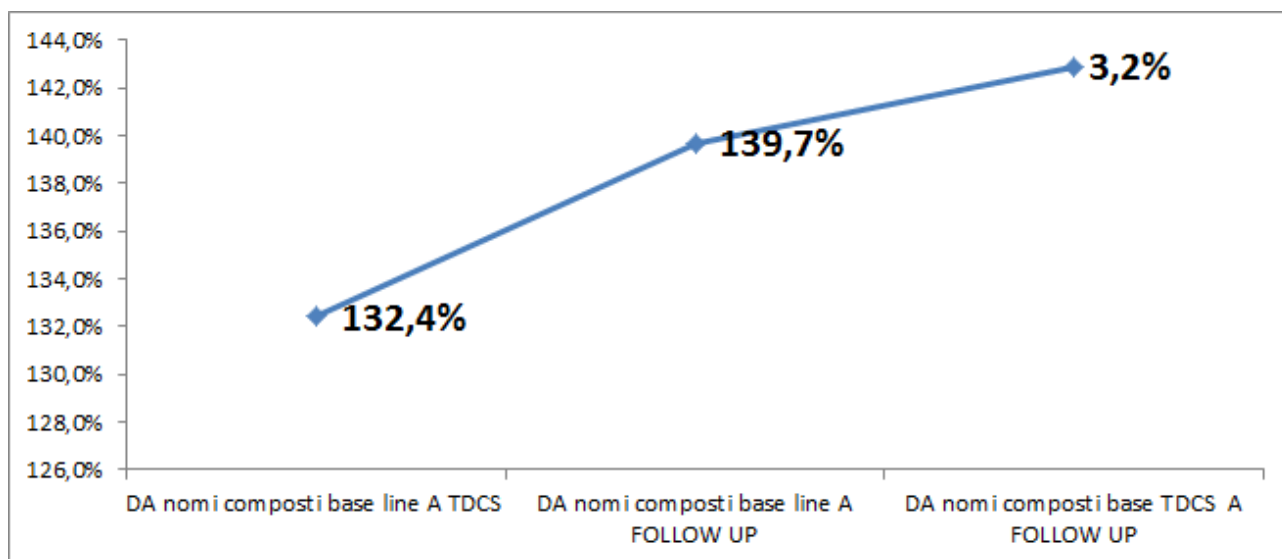


Grafico 16. Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro nomi composti.



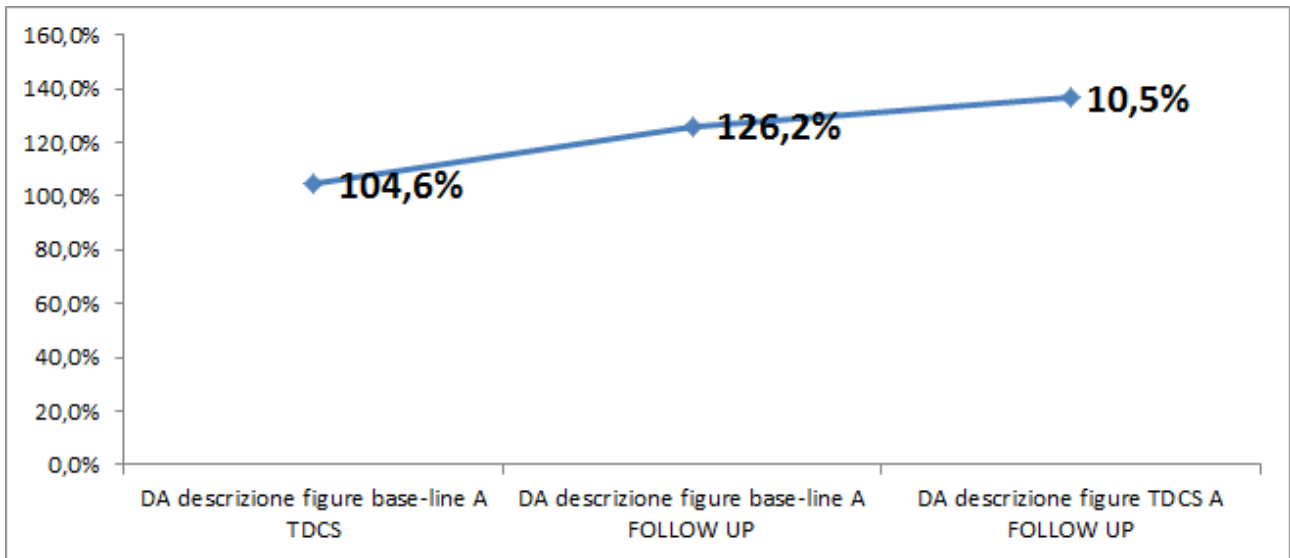
Tab.9 Differenze nelle diverse fasi relative al parametro descrizione figure.

Soggetto	descrizione figure base-line	tdcs descrizione figure	follow up descrizione figure
1	4	27	26
2	15	18	21
3	0	8	10
4	8	18	17
5	9	9	11
6	0	3	3
7	0	0	2
8	18	23	25
9	0	5	11
10	11	22	21
	6,5	13,3	14,7

Grafico 17. Differenze nelle diverse fasi relative al parametro descrizione figure.



Grafico18.Scostamento percentuale relativo alla differenza nelle diverse fasi del parametro descrizione figure



4.8.1Analisi statistica

I dati sono stati elaborati secondo un disegno di analisi della varianza a misure ripetute 2 (gruppi:sperimentale versus controllo) x 3 (fasi: pre-test, post-test, follow-up) X 10 (Item del test Achener). I dati sono stati elaborati in rapporto ad ognuno dei parametri presi in considerazione (10 item della batteria Achener).

Di seguito vengono analizzati i dati relativi alle abilità di ripetizione. In riferimento alla prima variabile (suoni), la variabile gruppi presenta effetti significativi, $F(1,18)=8,32, p<.01$. Questo dato indica che i gruppi si differenziano in maniera statisticamente significativa, in particolare si osserva che l’interazione gruppi x fasi è altamente significativa infatti $F(2,36)=4,68, p<.01$ (figura 1). Il gruppo di controllo, a differenza del gruppo sottoposto a tDCS anodica, presenta un trend che si mantiene costante nelle diverse fasi nel follow-up. Questo risultato è confermato dal confronto con il t test per dati dipendenti fra pre-test e post-test che, nel gruppo sperimentale presenta differenze statisticamente significative $t(19) = 4,2, p<.001$ mentre resta uguale nel confronto fra post-test e follow-up $t(19)=0,8, p<.05$.

Figura1. Interazione gruppi per fasi relativo al parametro “suoni”

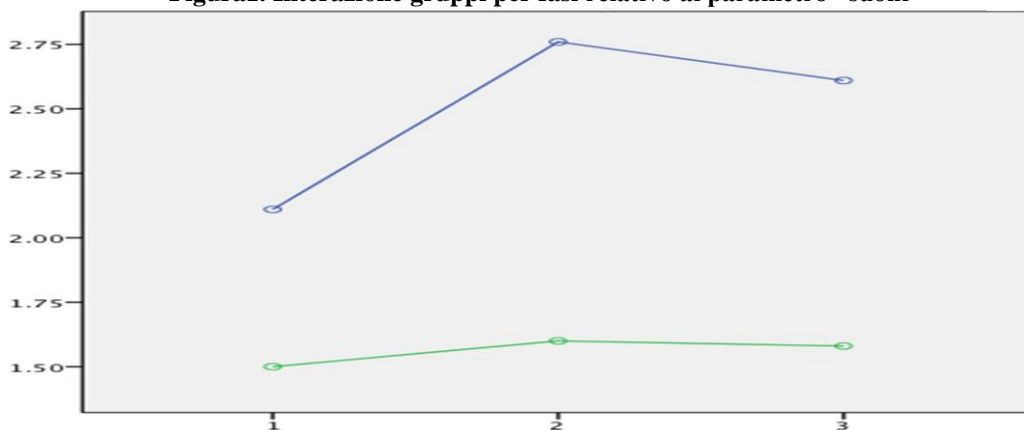
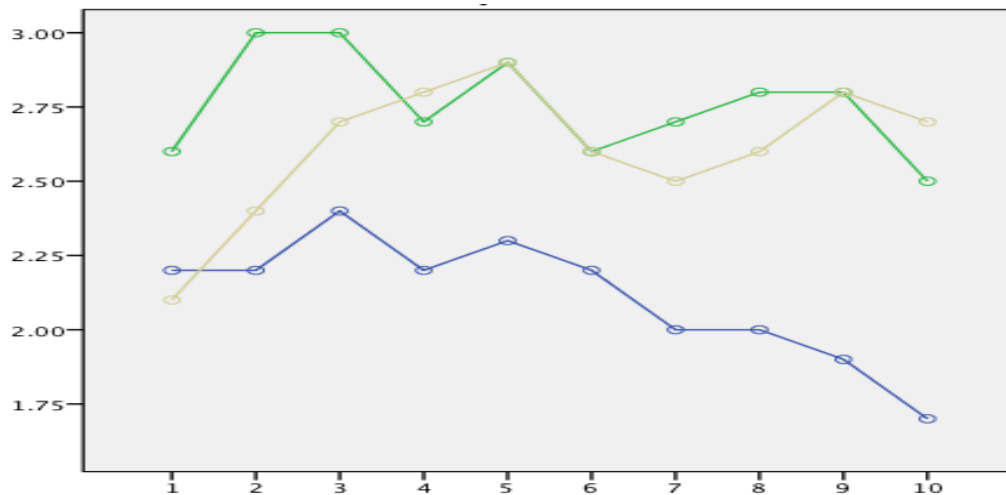


Figura 2. Andamento delle riproduzioni dei suoni nei 10 items



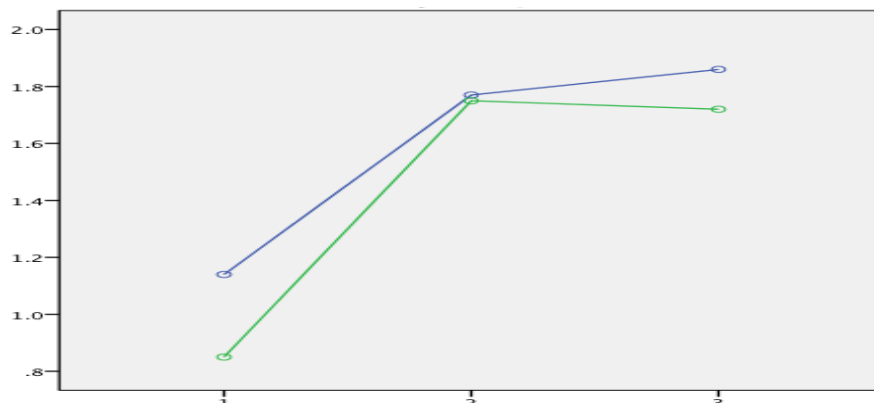
La figura 2 è invece rappresentativa dell'andamento della riproduzione dei suoni in tutti e 10 gli item all'interno dei due gruppi. Come si evince dal grafico solo nel gruppo sperimentale si osserva un trend in costante miglioramento che si mantiene stabile nel post test e nel follow-up.

In riferimento al secondo parametro (parole), la variabile gruppo presenta effetti significativi, $F(1,18)=24,9$, $p<.01$. Tale dato indica la differenza fra i due gruppi come rappresentato in figura 3, in cui il gruppo di controllo non si modifica mentre il gruppo sperimentale presenta un trend in aumento del numero di parole prodotte nel post-test mantendosi costante nel successivo follow-up. Il t-student di confronto per dati dipendenti presenta effetti significativi nel confronto fra fase di pre e post-test $t(19)=0,8$ $p<0.5$ nel gruppo sperimentale mentre non evidenzia variazioni significative nel confronto fra la fase di post-test e follow-up e non evidenzia differenze statisticamente significative nel gruppo di controllo.

In merito alla variabile prestiti e parole straniere, la variabile gruppo non presenta effetti significativi, $F(2,36)=0,36$, $p<0,48$ pertanto non ci sono differenze significative rispetto ai controlli. La variabile fasi del gruppo sperimentale presenta una differenza statisticamente significativa fra le fasi di pretest e post-test.

In riferimento alle frasi, la variabile gruppo presenta effetti significativi, $F(1,18)=3,57$, $p<.05$. Per quanto riguarda le fasi, vi sono effetti significativi nel solo confronto fra la fase di pre-test e post-test del gruppo sperimentale dove $t(18)= 3,75$, $p<.001$. Non si apprezzano invece differenze nelle fasi all'interno del gruppo di controllo.

Figura 3. Interazione fasi per gruppo



Di seguito vengono analizzati i dati relativi alle abilità di denominazione. In riferimento alla prima variabile denominazione oggetti, l'interazione gruppi per fasi presenta effetti significativi $F(2,36)=14,84, p<.01$ inoltre si assiste all'interno del gruppo sperimentale come vediamo in figura 5 differenze significative tra la fase di pre e post test $t(19) = 4,1, p<.001$ e nessuna differenza tra post-test e follow-up .

Anche per la variabile colori, l'interazione fasi per gruppi presenta effetti significativi $F(2,36)=5,46, p<.05$. Anche in questa variabile all'interno del gruppo sperimentale si osserva lo stesso andamento del precedente, per cui sono presenti differenze che raggiungono la significatività statistica tra la fase di pre e post-test significative $t(19) = 3,92, p<.001$ e nessuna differenza tra post-test e follow-up.

In relazione alla variabile "nomi composti", l'interazione fasi per gruppi presenta effetti significativi $F(2,36)=5,41, p<.01$. Dati simili sono osservabili anche per la variabile descrizione figure dove l'interazione fasi per gruppi presenta effetti significativi $F(2,36)=13,32, p<.06$.

In conclusione dal confronto fra il gruppo sperimentale ed il gruppo di controllo entrambe le variabili ripetizione e denominazione presentano differenze statisticamente significative. In particolare il gruppo sottoposto alla stimolazione transcranica rispetto al gruppo sham presenta delle performance migliori mentre non si osservano variazioni statisticamente significative nel gruppo di controllo.

In riferimento alla valutazione neurofisiologica l'acquisizione del segnale EEG è stata eseguita tramite 19 elettrodi in Ag/AgCl disposti secondo sistema internazionale 10-20 ad una frequenza di campionamento di 256 Hz. Il segnale è stato sottoposto ad un primo filtraggio mediante l'utilizzo di una Banda Passante (BP) di 1,6-70 Hz. L'analisi dei tracciati è consistita in un ulteriore filtraggio passa-banda tra 0,5 e 30 Hz. Successivamente, è stata applicata una trasformata Fast Fourier su epoche di 2 sec per ogni registrazione EEG. Per ogni sito di stimolazione, si è osservato se la rete cerebrale funzionale presenta una struttura di connettività funzionale, in tutte le bande di frequenza EEG: delta (0,5-3,5 Hz), teta (4-7,5 Hz), alfa (8-12,5 Hz), e beta (13-30 Hz), significativamente diversa rispetto ad una configurazione completamente casuale (random). I pattern stimati di connettività funzionale furono caratterizzati da due parametri globali secondo la teoria dei grafi: l'efficienza globale (Eg) della rete, capace di descrivere l'integrazione dei flussi di informazione tra le diverse aree cerebrali, e la modularità misura quanto un network è organizzato in moduli con elevato grado di clustering di alto livello. Tale struttura modulare, si costituisce prevalentemente di diversi gruppi di regioni cerebrali funzionalmente simili fra loro. Le analisi statistiche sono state separate per i due gruppi (sperimentale e controllo) e per sito di stimolazione effettiva. Per ogni banda di frequenza e sito di stimolazione effettiva (F3, C3, P3), è stata eseguita un'analisi della varianza a misure ripetute. L'analisi dell'Anova a misure ripetute calcolata sulla modularità nella banda di frequenza Beta ha rivelato una interazione significativa tra i fattori stimolazione e tDCS ($p=0,035$), quando veniva applicato lo stimolatore sull'area DLPF nel gruppo di soggetti sperimentali. Le analisi post-hoc hanno evidenziato un aumento significativo della modularità dei network cerebrali (tDCS pre: $0,16\pm 0,007$; tDCS post: $0,21\pm 0,014$) per la stimolazione in DLPF ($p=0,009$) rispetto alla Sham ($p=0,76$) (Fig. 4). L'analisi di coerenza e potenza banda dei ritmi cerebrali conferma i risultati statistici, evidenziando nelle regioni sottoposte a tDCS nel gruppo sperimentale un significativo incremento della potenza del ritmo Beta che passa da valori compresi fra 14 e

18 HZ in fase di pre test a valori superiori 24 HZ in fase di post test e follow-up (figura 4-5). In riferimento al gruppo di controllo l'analisi EEG (figura 4-6) non evidenzia sostanziali modificazioni della potenza banda rispetto alla condizione iniziale (Beta basale 14.6 – 15HZ ; Beta Post test 15,3 – 16,1HZ Beta 15,2 – 18HZ).

Figura 4. Andamento della modularità dei network cerebrali, prima e dopo stimolazione con tDCS nei due gruppi: sperimentale Vs placebo

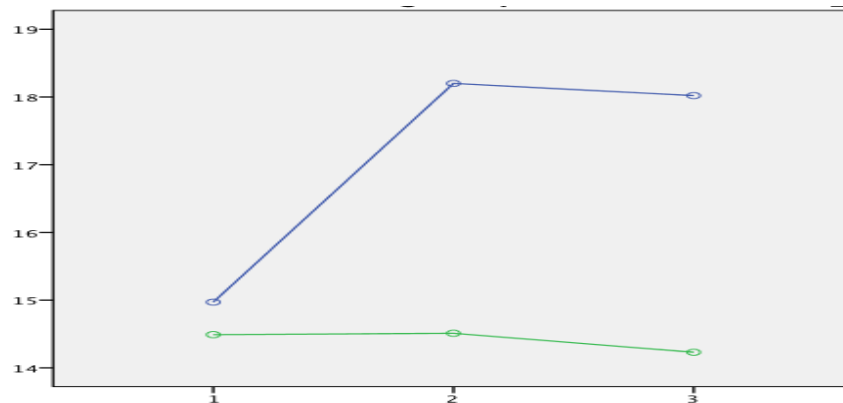
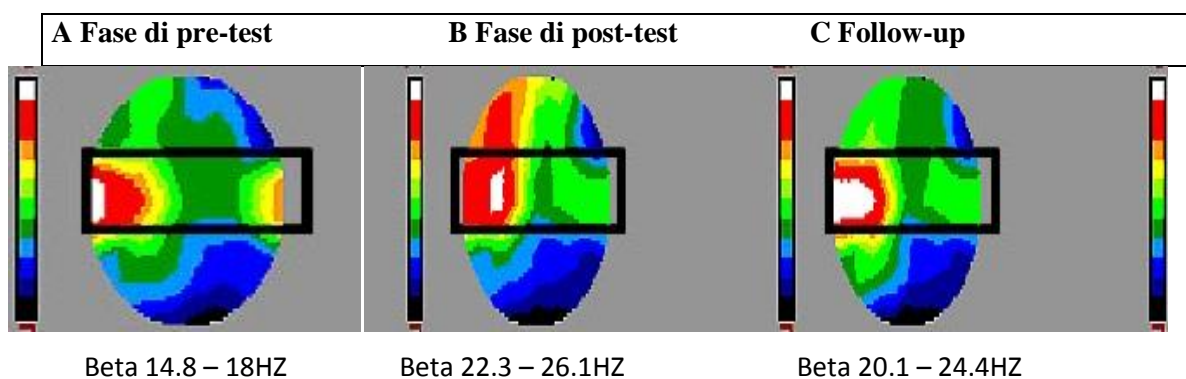
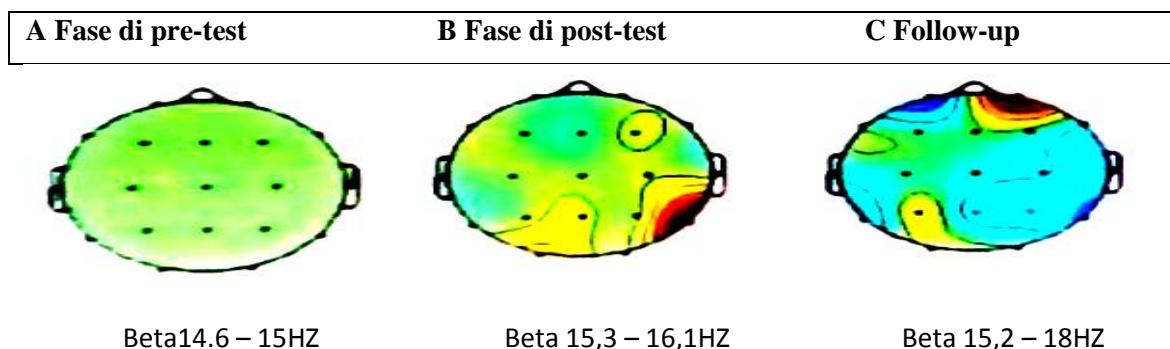


Figura 5. Analisi di coerenza del ritmo Beta EEG sulle regioni della corteccia fronto temporale di sinistra nel Gruppo tDCS Anodica



L'attivazione corticale, intesa come variazione indotta dalla tDCS, rispetto all'attività a riposo (in percentuale con segno positivo), è indicata con il colore rosso. In A si osserva la distribuzione dei ritmi EEG al T0, prima della sperimentazione, in B i correlati osservati immediatamente dopo la tDCS al T1 (a 10 giorni di distanza) e in C al T2 (nel follow-up, a tre mesi di distanza).

Figura 6. Analisi di coerenza del ritmo Beta EEG sulle regioni della corteccia fronto temporale di sinistra nel Gruppo tDCS Placebo



L'analisi di coerenza EEG del ritmo beta registrato dalla corteccia fronto-temporale di sinistra nel gruppo SHAM, non evidenzia significative attivazioni dell'area corticale stimolata. In A si osserva la distribuzione del ritmo EEG al T0, in B i correlati osservati immediatamente dopo la tDCS al T1 (a 10 giorni di distanza) e in C al T2 (nel follow-up, a tre mesi di distanza).

4.9 Discussione

Tutti i pazienti hanno completato lo studio ottenendo buoni risultati. In ogni giornata di stimolazione, le prestazioni nei compiti di denominazione e ripetizione durante la tDCS sono migliori di quelle ottenute rispetto al gruppo di controllo. Il nostro studio rappresenta il primo tentativo di dimostrare gli effetti benefici a medio e lungo termine di sedute multiple di tDCS online in pazienti con afasia cronica. Il significativo effetto benefico dalla tDCS è stato mantenuto per un periodo di 6 mesi dopo la fine della stimolazione, indipendentemente dalla difficoltà degli stimoli presentati. I pazienti, inoltre, hanno mostrato un miglioramento delle performance linguistiche non limitato al set di parole utilizzate nelle due liste, ma anche generalizzato ad altri compiti linguistici.

Visti i risultati ottenuti, l'assenza di effetti collaterali, la facilità di esecuzione e gli effetti indotti rispetto alle modificazioni della elettrogenesi cerebrale, riteniamo che la tDCS, ripetuta ad intervalli regolari di tempo, possa essere in grado di determinare un miglioramento stabile delle abilità linguistiche in pazienti affetti da afasia di Broca cronicizzata.

Parte quinta: la Malattia di Alzheimer

5.Introduzione

La malattia di Alzheimer viene classificata tra le demenze corticali primarie tra cui anche la malattia di Pick e la demenza Frontale. Ha un esordio prevalentemente senile ma può manifestarsi anche in epoca presenile ed esistono anche rare forme familiari di insorgenza precoce, in genere nella IV e V decade di vita (Yu et al., 2000). La diagnosi clinica della malattia può portare ad una diagnosi "probabile" di malattia, basata sull'osservazione di un decadimento progressivo della memoria per almeno 6 mesi e di un altro settore cognitivo, e può essere definitivamente accertata solo post-mortem attraverso il riscontro di placche senili di proteina (beta amiloide) e di aggregati neurofibrillari (proteina tau fosforilata) corticali, che permettono così di escludere gli altri tipi di demenza.

La malattia è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo Alois Alzheimer, durante la Convenzione Psichiatrica di Tubingen (3-4 novembre 1906) quando Alzheimer presentò il caso di una donna di 51 anni affetta da una forma di demenza sconosciuta. Soltanto nel 1910, però, la malattia ebbe un nome, quando Emil Kraepelin, il più famoso psichiatra di lingua tedesca dell'epoca, pubblicò il suo trattato "Psichiatria", nel quale definiva una nuova forma di demenza scoperta da Alzheimer, chiamandola appunto malattia di Alzheimer. Nella caratterizzazione della malattia ebbe un ruolo chiave anche un giovane ricercatore italiano di nome Gaetano Perusini, in quanto nel 1909 tre sue nuove osservazioni anatomiche cliniche molto dettagliate e i suoi studi negli anni successivi (1910-1911) consentirono la comprensione di alcuni rilevanti aspetti clinici e patologici, così che la malattia, detta in Germania "morbo di Alzheimer", divenne nota in Italia come "morbo di Alzheimer-Perusini", Kraepelin la ritenne una forma grave e precoce di demenza senile e questa caratterizzazione gli parve sufficiente per definire una nuova categoria diagnostica che indicò, ufficialmente per la prima volta, con il nome di malattia di Alzheimer.

5.1 Aspetti clinici della AD

L'esordio sintomatico è spesso "insidioso", i primi disturbi sono difficili da riconoscere e da distinguere dai fisiologici e frequenti disordini cognitivi di una persona anziana sana.

Anche nel momento in cui si attribuisce un significato patologico ad alcuni comportamenti non è semplice arrivare ad una sicura diagnosi differenziale, in quanto alcuni sintomi sono comuni ad altre patologie, quali la depressione e la demenza vascolare.

Gli aspetti clinici della malattia sono: deficit della memoria inizialmente a breve termine e poi anche remota; disfunzioni dei lobi frontali che si palesano con cambiamenti del comportamento, alterazione dell'umore e della personalità, presenza di atteggiamenti aggressivi, deliri e allucinazioni; perdita di iniziativa e di interesse; problemi di linguaggio (afasia); episodi confusionali; disorientamento spazio temporale; incapacità nel riconoscere persone, cose e luoghi (agnosia); difficoltà nella scrittura (agrafia); incapacità a compiere gli atti quotidiani della vita quali lavarsi, vestirsi, mangiare (aprassia); peggioramento delle capacità di ragionamento, di pianificazione e di giudizio; disturbi motori. La malattia ha il tipico andamento progressivo delle demenze, suddiviso in 3 stadi e dura in media 7-10 anni. Il primo stadio (*demenza lieve*) dura da 2 a 4

anni, è caratterizzato dai sintomi d'esordio ed è facilmente evidenziato in pazienti giovani o che svolgono ancora attività lavorative o professionali, può invece sfuggire in pazienti anziani o che non svolgono compiti impegnativi da un punto di vista intellettuale. In una fase intermedia della malattia (*demenza moderata*) di durata da 2-10 anni, i danni alla memoria si accentuano, compare anche amnesia remota e i primi sintomi conclamati cognitivi, comportamentali e funzionali (Querfurth, LaFerla, 2010).

Nelle fasi avanzate della demenza (*demenza grave*) che durano mediamente 3 anni, i sintomi conclamati peggiorano, il paziente è incapace di svolgere qualsiasi attività della vita quotidiana e compare generalmente incontinenza. Non si riconoscono neanche i volti dei familiari più stretti, la memoria a breve e lungo termine è totalmente persa ed il paziente può divenire mutacico ed acinetico. Si manifesta disfagia e può essere necessaria l'alimentazione artificiale. Il rischio di complicanze, quali malnutrizione, disidratazione, malattie infettive (polmoniti soprattutto), fratture e piaghe da decubito diviene elevato. Nelle fasi terminali della demenza sono frequenti complicanze infettive, soprattutto bronco- polmonari, che costituiscono la causa più frequente di morte.

5.2 Fisiopatologia

Dall'analisi istologica dei tessuti cerebrali di pazienti affetti da demenza tipo AD è stato riscontrato un accumulo extracellulare di una proteina costituita da 42 amminoacidi, chiamata beta amiloide (Origlia et al., 2009). Questa proteina deriva dalla beta-APP (amiloid protein precursor), una glicoproteina ubiquitaria codificata da un gene posto sul cromosoma 21, la cui lunghezza varia da 695 a 770 aminoacidi con l'estremità carbossiterminale rivolta verso il lato intracellulare e l'estremità amminoterminale glicosilata, rivolta verso il versante extracellulare figura1. Da quest'ultima proviene il peptide beta-amiloide che si trova esattamente a metà della proteina APP. La funzione fisiologica della beta-APP non è chiara, ma sappiamo che va incontro ad un processo di scissione enzimatica in due tappe secondo due diverse modalità. La prima dà sempre luogo ad un peptide non patogeno e prevede una tappa catalizzata da un enzima detto *α-secretasi* in grado di scindere dal precursore un peptide a livello del 687-688 AA, nel versante extracellulare, vicino alla membrana, noto come sAPP alfa (frammento alfa solubile), che viene secreto ed un frammento C-terminale (C83) ancorato alla membrana tagliato successivamente dalla *g-secretasi*, il cui sito di taglio è all'interno del doppio strato lipidico e la cui azione dà origine a tre frammenti privi di attività biologica: uno piccolissimo da 3KDa definito p3, uno un po' più lungo e uno che si chiama alfa-amiloide. La seconda modalità, differisce per l'enzima che interviene nella prima tappa, che in questo caso è la *β-secretasi*. Il sito di taglio della beta-secretasi è a livello degli amminoacidi 671-672 e si trova nel versante extra. In seguito al taglio β-secretasico viene prodotta una proteina, poi secreta, nota come sAPPβ (frammento beta solubile), dal lato amino-terminale e una più piccola ancora legata alle membrana plasmatica dal lato carbossi-terminale (C99), la CTFβ (Carboxy-Terminal Fragment β). Quest'ultimo residuo, è quello che va incontro al secondo taglio, da parte della *g-secretasi* che genera a seconda del punto di taglio (sempre a livello del doppio strato lipidico), per il 90% proteine di beta-amiloide di 40 aminoacidi (Aβ40) e, per la parte rimanente proteine di beta-amiloide con 42 aminoacidi, Aβ42 (Golde, 2003).

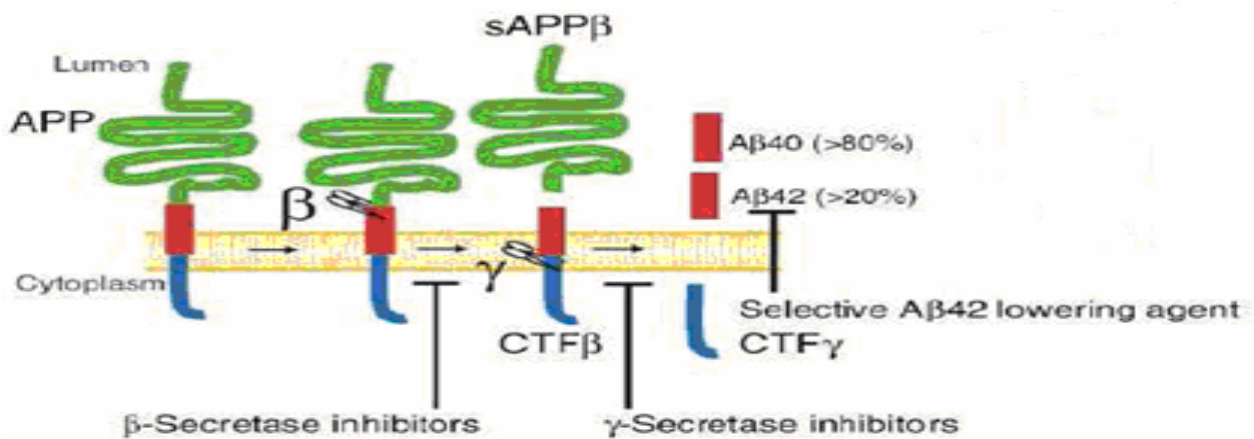


Figura 1. Meccanismo di formazione della proteina beta-amiloide (Blennow et al.,2005).

Queste ultime, inizialmente solubili, subiscono una modificazione conformazionale (misfolding), da alfa elica a foglietto beta che porta alla formazione, attraverso dimeri e oligomeri, di aggregati insolubili extracellulari sulla membrana dei neuroni, che man mano si uniscono formando placche neuronali dette anche placche amiloidi, sulle quali si accumulano anche proteine di Aβ40 e che tipicamente si osservano nei casi patologici (Querfurth, LaFerla, 2010).

Tali placche innescano un processo infiammatorio che richiama macrofagi e neutrofilii i quali produrranno citochine, interleuchine e TNF alfa che danneggiano irreversibilmente i neuroni. E' molto recente (Lustbader et al. 2004) uno studio in cui si sostiene che i depositi di beta-amiloide interagiscono con un enzima del mitocondrio chiamato ABAD portando alla distruzione del mitocondrio stesso ed, infine, alla morte dell'intera cellula neuronale. E' stato inoltre dimostrato che i depositi di beta-amiloide interagiscono con i lipidi della membrana cellulare portando a disgregazione della membrana stessa, stress ossidativo ed aumento della concentrazione del calcio intracellulare che conduce alla morte dei neuroni (Querfurth, LaFerla, 2010). Placche amiloidee sono state osservate anche in persone anziane non affette dalla malattia, sebbene in maniera molto più ridotta, ciò ha portato a concludere che in realtà tutti produciamo la proteina beta-amiloide, ma il problema consiste nel suo smaltimento, così mentre normalmente essa viene degradata dopo essersi staccata dalla cellula, nei soggetti patologici non viene prontamente secreta ed ha la possibilità di formare insieme insolubili e conseguentemente le placche. Per di più la correlazione tra densità delle placche e gravità della malattia è molto incerta, tuttavia la loro presenza massiccia nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale è specifica dei malati di Alzheimer. A tal proposito è bene evidenziare che la proteina precursore della sostanza amiloide viene sintetizzata anche in altri organi, perciò non si riesce a dare una spiegazione del perché solo nel cervello dia vita a depositi diffusi di materiale extracellulare.

Il problema, in sostanza, è se le placche di beta amiloide siano effettivamente la causa della demenza e questa domanda fondamentale quanto irrisolta è da anni al centro delle discussioni e della ricerca .

Ulteriori studi mettono in evidenza che nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni, una proteina tau, fosforilata in maniera anomala, si accumula in aggregati neurofibrillari o ammassi neurofibrillari (NFT) (Origlia et al., 2009).

La proteina tau ha la funzione di stabilizzare lo scheletro dell'assone, legando tra loro i microtubuli che lo costituiscono. Se essa viene iperfosforilata la sua capacità di interagire con i microtubuli diminuisce ed aumenta invece la sua capacità di associarsi, formando doppi filamenti elicoidali che si accumulano in matasse nel corpo cellulare costituendo aggregati anomali. Ciò porta al collasso della struttura microtubulare e ad una conseguente riduzione del trasporto assonale e quindi degenerazione neuronale. Tale anomala aggregazione si osserva anche nel cervello di persone sane e di soggetti affetti da altre forme di demenza. Particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni di grandi dimensioni come quelli presenti nell'ippocampo, corteccia olfattiva, amigdala, nuclei del proencefalo basale e parecchi nuclei del tronco (Phiel et al., 2003). In particolare l'ippocampo interviene nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione perciò la distruzione dei neuroni di queste zone è ritenuta essere la causa della perdita di memoria dei malati. L'anormale fosforilazione è stata attribuita all'attività fosforilatrice dell'enzima glicogeno sintasi chinasi 3 o GSK3 (Glycogen Synthase Kinase3) e alla capacità della beta-amiloide di determinare un incremento della concentrazione intracellulare del calcio. Questo renderebbe la cellula più sensibile a neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato con conseguente ipereccitazione dei recettori di membrana del glutammato e attivazione delle chinasi calcio-dipendenti con alterata fosforilazione della proteina tau e successiva formazione di grovigli neuro fibrillari (Phiel et al., 2003). Non è chiaro se i grovigli rappresentino una causa o una conseguenza della neurodegenerazione che si osserva nella malattia di Alzheimer e mutazioni del gene che codifica per Tau non sono associate a forme ereditarie di Alzheimer. In (Figura 2), nel confronto tra cellule neuronali di soggetti sani e patologici, si evidenzia come gli aggregati neuro fibrillari siano posti all'interno del neurone stesso, al contrario delle placche amiloidee che si trovano invece nella zona extracellulare.

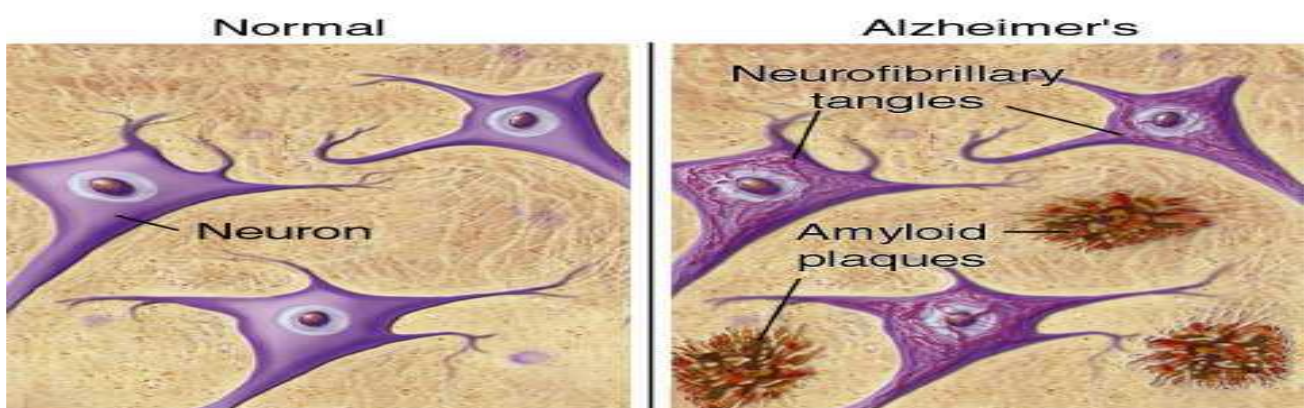


Figura 2. Confronto tra neuroni di soggetti sani e patologici visualizzati mediante Silver staining (Daniel P Perl, Mont Sinai School of Medicine)

Oltre a ciò, nel cervello si assiste ad una forte diminuzione della sintesi e del rilascio di neurotrasmettitori, in particolar modo della acetilcolina, un neurotrasmettitore legato direttamente alla funzione della memoria e ad altre funzioni intellettive (Filley et al., 2009). I neuroni, quindi, non sono più in grado di trasmettere

correttamente gli impulsi nervosi: da qui nascono i sintomi caratteristici della malattia, come perdita della memoria e difficoltà di linguaggio.

Probabile causa della diminuzione di acetilcolina è una degenerazione a carico del nucleo basale di Meynert, un'importante struttura implicata nel circuito della memoria per le sue connessioni e proiezioni colinergiche che raggiungono la corteccia, l'ippocampo, l'amigdala, il bulbo olfattivo, il talamo e il tronco dell'encefalo. Altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali somatostatina, vasopressina, CRF (corticotropin-releasing factor), serotonina, dopamina, risultano alterati nell'Alzheimer, sebbene il loro esatto ruolo nella patogenesi della malattia non sia del tutto chiarito. Anche nei soggetti anziani si può riscontrare una riduzione dei neurotrasmettitori in determinate zone cerebrali, segno di spopolamento neuronale, ma la concentrazione dei metaboliti di tali neurotrasmettitori non è però inferiore a quella dei giovani. Questo significa che nei soggetti anziani che non presentano disturbi cognitivi esistono dei meccanismi di compenso. Questo meccanismo di compenso è assente nei soggetti affetti da demenza di Alzheimer in cui vi è una riduzione anche dei metaboliti di tutti i principali neurotrasmettitori .

Nei pazienti affetti da Alzheimer vi è sovente una pronunciata atrofia corticale (Mouton et al.,1998), un'evidente assottigliamento della sostanza grigia dovuta a perdita neuronale (Figura 3). Più colpite sono generalmente il lobo frontale, la parte anteriore del lobo temporale e il lobo parietale, l'ippocampo, le aree limbiche ed il nucleo basale di Meynert.



Figura 3. Confronto tra la corteccia di pazienti sani (sinistra) e affetti da Alzheimer (destra).
(Da Robbins e Everitt, 1993, MIT Press, USA)

Nel cervello di individui affetti da Alzheimer si riscontra anche degenerazione delle strutture sinaptiche (Querfurth, LaFerla, 2010): vi è una diminuzione del numero di sinapsi, e carenza di sostanze proteiche presenti nelle sinapsi di cellule sane. La degenerazione ha una buona correlazione con il decorso e l'entità della malattia. I sintomi demenziali potrebbero dunque essere interpretati come conseguenza del deficit sinaptico, in quanto i neuroni hanno difficoltà nel comunicare.

5.3 Eziopatogenesi della demenza di Alzheimer

L'AD nel 90% dei casi non ha origine genetica, anche se ci può essere una certa predisposizione per cui in famiglie in cui ci sono casi di AD relativamente precoci è più probabile che altri membri della famiglia sviluppino la malattia (Laureys et al., 2004; Zeman, 2001; Bekinschtein et al., 2009). Avvalorano questa ipotesi studi epidemiologici secondo cui le donne risultano essere più esposte all'Alzheimer e studi condotti sui gemelli, che evidenziano quanto sia più frequente che gemelli monozigoti siano colpiti entrambi dalla malattia rispetto ai gemelli dizigoti, nei quali il patrimonio genetico non è identico. Si può dunque fare un'importante distinzione fra le forme di Alzheimer sporadiche e quelle familiari. Le forme sporadiche sono la maggioranza (circa il 90%) e sono quelle in cui la malattia colpisce un solo membro di una famiglia, oltre o prima dei 65 anni (esordio tardivo o precoce, detto anche senile o presenile). Nelle forme familiari (il restante 10% dei casi) più persone sono invece colpite nella stessa famiglia. Le forme familiari si possono a loro volta suddividere in forma tardiva familiare (AD2) che si diagnostica nelle famiglie con più casi di malattia che si manifestano dopo i 60 anni e forme precoci familiari (AD1, AD3, AD4) che si diagnosticano nelle famiglie con più casi della malattia che si manifestano prima dei 60 anni. Sono forme più rare nell'ambito delle quali prende maggiormente piede l'ipotesi genetica dell'origine della malattia, per cui sebbene siano meno importanti dal punto di vista epidemiologico perchè rappresentano una minoranza, vengono studiate al fine di comprendere importanti informazioni sul meccanismo di insorgenza della malattia (Janssen et al., 2003). Tutte le mutazioni genetiche che causano AD familiare sono associate ad un aumento selettivo del peptide A β 42 o del livello generale di beta-amiloide. Il primo gene identificato come responsabile dell'esordio precoce AD1 (35- 50 anni) è sito sul cromosoma 21 e codifica per la proteina precursore della beta-amiloide (beta-APP) aumentando la produzione di beta-amiloide totale e delle sue forme in particolar modo di quella tossica (Howard et al., 2006). La mutazione di questo gene è responsabile di non più del 5% dei casi di AD. Le mutazioni a carico dell'APP sono localizzate in prossimità dei siti di taglio del livello degli aminoacidi 670–671, favorendo il taglio β - secretasico, conducono ad un aumento della produzione di beta-amiloide totale di circa 8 volte; la mutazione in posizione 712 inibisce il taglio α secretasico, favorendo la produzione di β A; mutazioni ai codoni 716, 717 e 723 favoriscono il taglio γ - secretasico in posizione 42 o 43; Le preseniline sono proteine che hanno la funzione di tagliare la proteina amiloide, per questo un'ipotesi è che il loro alterato funzionamento potrebbe portarne l'accumulo (Howard e Filley, 2009; Wang e Ding, 2008; Hoenicka, 2006). Il gene della presenilina 1 (PSEN1) localizzato nel cromosoma 14, risulta alterato nella forma AD3. In particolare oltre 150 diverse mutazioni di questo gene sono state finora identificate in pazienti con forme familiari ad esordio precoce.

Queste mutazioni rappresentano la causa più comune (70%) di origine genetica della malattia di Alzheimer familiare ad esordio precoce (28-60 anni). Dati molto recenti dimostrano che le preseniline sono in grado di aumentare l'attività proteasica della gamma-secretasi e quindi di beta-amiloide e secondo alcuni autori sarebbero esse stesse delle gamma-secretasi (Selkoe, 1999; Soto, 1999; Haass e De Strooper, 1999). Più rare sono le mutazioni del gene della presenilina 2 (PSEN2) localizzato nel cromosoma 1, correlato alla forma AD4. Fino ad oggi solo 10 mutazioni della presenilina 2 sono state identificate in pazienti appartenenti a

famiglie americane originarie dell'Europa dell'est ed in una famiglia italiana del nord-est. In queste famiglie l'età di esordio può essere precoce (30 anni) ma anche molto tardiva (oltre 80). Tali modifiche da una parte accelererebbero l'apoptosi delle cellule cerebrali, cioè la loro "morte programmata", rendendole più sensibili all'attacco della beta amiloide, dall'altra, provocherebbero una maggiore produzione della proteina stessa come risposta allo stress.

Studi recenti hanno evidenziato che sia per le forme familiari che per quelle sporadiche, vi è un altro gene correlato con la malattia, una variante polimorfica del gene che codifica per la Apolipoproteina E localizzato a livello del cromosoma 19 (denominata ApoE-e4) presente nel 15% della popolazione sana ma nel 50% della popolazione affetta da Alzheimer. L'ApoE (apolipoproteina E) è una proteina plasmatica, coinvolta nel trasporto del colesterolo e la sua distribuzione nei processi di riparazione delle membrane neuronali. Esistono tre forme di apolipoproteina E: ApoE2, ApoE3, ApoE4, codificate da tre diversi alleli (E2, E3, E4).

Diversi studi (Corder et al., 1993) hanno mostrato che l'allele 4 (E4) è più frequente nelle persone affette da Alzheimer rispetto a quelle sane; la presenza del genotipo E4/E4 determinerebbe un aumento di circa tre volte il rischio di sviluppare la malattia nelle forme ad esordio tardivo, familiari e sporadiche. In realtà l'ApoE aumenta notevolmente la degradazione della proteina beta amiloide ma la capacità di svolgere questa degradazione varia in maniera sostanziale fra le diverse isoforme della ApoE, così mentre le isoforme ApoE2 e ApoE3 avrebbero un effetto protettivo nei confronti della malattia, l'isoforma ApoE4 mostra un deficit nella capacità di sostenere tale processo. Analisi condotte in vitro hanno evidenziato che questa particolare isoforma facilita la formazione del nocciolo iniziale della placca e successivamente facilita l'aggregarsi delle molecole di beta-A4 a tale nocciolo poichè è fortemente affine al peptide stesso (Strittmatter et al., 1993). La genotipizzazione dell'ApoE, tuttavia, fornisce un dato solamente indicativo, cioè di predisposizione e che non basta da solo a stabilire la diagnosi: infatti, quasi la metà delle persone affette da AD non possiede questo allele, che d'altra parte può essere presente anche in una discreta percentuale di persone sane.

Tra gli svariati studi che si stanno conducendo sulla componente genetica dell'AD, degna di nota è la scoperta del gene codificante per la Nicastrina, il cui nome è dovuto alla città calabrese di Nicastro, di cui erano originarie le persone oggetto, ben 40 anni fa, del primo studio genetico sulla forma familiare dell'AD (Yu et al., 2000). Studiando infatti le forme genetiche di AD ad esordio precoce, si è isolato un gene coinvolto, localizzato sul cromosoma 1; questo codifica per una glicoproteina delle membrane neuronali, che appartiene al gruppo delle preseniline la nicastrina. Per spiegare la funzione della nicastrina sono stati ipotizzati due modelli molecolari: il primo attribuisce alla nicastrina un ruolo nel legare i substrati nel complesso preseniline/g-secretasi, il secondo, invece, vede la nicastrina come possibile regolatore dell'attività della g-secretasi. Nelle forme mutate la nicastrina potrebbe essere causa di alcune forme di Alzheimer, aumentando la secrezione dei peptidi Ab40 ed Ab42. È importante sottolineare che l'ipotesi genetica è in fase di studio ed approfondimento e che attualmente nessun marcatore genetico è utile come test diagnostico o per effettuare screening di popolazione predittivi della malattia.

Oltre alle cause genetiche, altre ipotesi sono correlate all'esordio della malattia di Alzheimer: una concentrazione intracellulare di metalli quali il più noto l'alluminio (che tende ad accumularsi all'interno

delle placche senili sotto forma di silicato) significativamente più elevata nei pazienti con AD, rispetto ai controlli non affetti da tale malattia fa pensare ad una possibile origine neurotossica della patologia; una più marcata alterazione delle risposte immunitarie, nei soggetti affetti da AD rispetto ai controlli sani, sembra indicare un coinvolgimento del sistema immunitario nell'eziologia della AD. E' stata proposta anche un'ipotesi basata sull'alterata permeabilità della barriera emato-encefalica che permetterebbe a sostanze tossiche (ad es., auto-anticorpi contro i neuroni che producono acetilcolina) di entrare nel SNC e di attaccare i neuroni. Studi epidemiologici caso-controllo hanno dimostrato un più alto rischio di sviluppare AD, nei soggetti che hanno subito gravi traumi cranici. Data la vicinanza delle strutture limbiche e dell'ippocampo che risultano particolarmente colpite, con il rinencefalo, alcuni autori hanno proposto che le matasse siano dovute a agenti virali che si introducono dai recettori olfattivi (ipotesi virale). E' stato anche dimostrato che ripetuti traumi cranici possono provocare alterazioni tissutali del tipo della degenerazione neurofibrillare, la cosiddetta "punch-drunk syndrome". Inoltre, sono state evidenziate, già in fasi precoci della malattia, riduzione della perfusione ematica a livello della corteccia temporo-parietale ed asimmetrie lesionali.

5.4 Fattori di Rischio

Si definiscono fattori di rischio le condizioni e le caratteristiche dello stile di vita la cui presenza favorisce ma non determina, con meccanismo causa-effetto, la comparsa di una malattia. La loro correzione o rimozione consente di prevenire l'insorgere della malattia prima che questa si manifesti. Nel caso delle malattie cardiocircolatorie, come l'aterosclerosi, sono stati individuati più di 200 fattori di rischio come la sedentarietà, l'eccessivo consumo di grassi, il fumo di sigaretta, l'ipertensione arteriosa e l'obesità, solo per citarne alcuni. Nel caso della malattia di Alzheimer, invece, non si è ancora giunti all'individuazione di ben determinati fattori di rischio poiché molti sono gli imputati, ma poche sono le prove e gli indizi che consentono con sicurezza di fornire indicazioni preventive efficaci. E' possibile tuttavia, differenziare tali fattori in due categorie: fattori di rischio certi (per i quali è stata provata l'associazione con la malattia) e fattori di rischio possibili (per i quali invece, esiste una forte ma non costante associazione con la malattia). Tra i fattori di rischio certi vi sono l'età, che rappresenta sicuramente il fattore di rischio più rilevante per le demenze, inclusa la malattia di Alzheimer, dal momento che la probabilità di contrarre la malattia aumenta in modo esponenziale con l'età, ma anche fattori familiari e genetici.

I fattori possibili includono invece i traumi cranici, studiati da Graves che ha dimostrato che esiste una forte associazione causa-effetto fra trauma cranico e malattia di Alzheimer, poiché il trauma cranico accelerando la produzione di amiloide, determina lo sviluppo della malattia dementigena; fattori vascolari in quanto diversi studi recenti suggeriscono che soggetti esposti a fattori di rischio vascolare e soggetti che hanno avuto un infarto miocardico, hanno una maggior probabilità di sviluppare la malattia. A tal proposito si ritiene che il meccanismo che porta alla produzione di amiloide si attivi in seguito ad un evento ipossico, in quanto la proteina precursore dell'amiloide, contiene elementi promotori che si attivano in caso di trauma o ipossia; sindrome di Down, malattia genetica dovuta ad una mutazione del gene localizzato in una particolare posizione del cromosoma 21 che si trova nelle immediate vicinanze del cromosoma responsabile

dell'insorgenza precoce della malattia di Alzheimer. Il collegamento tra la sindrome di Down e la demenza di tipo Alzheimer sta nel fatto che la mutazione può coinvolgere l'intero segmento che riguarda i due geni e perciò le persone che presentano la prima delle due mutazioni, sono più a rischio delle altre di avere anche la seconda; basso livello di istruzione anche se a tutt'oggi non è ancora stato chiarito il ruolo ricoperto dall'istruzione, ma è indubbio che la mancanza di attività mentale precoce, può condurre a un prematuro impoverimento della densità sinaptica e permettere quindi ai sintomi clinici della malattia di manifestarsi prima rispetto ai soggetti con un livello culturale più elevato e l'aver svolto un lavoro prevalentemente manuale e ripetitivo nel corso della vita è stato ipotizzato come fattore di rischio per demenza; anche la depressione aumenta moderatamente il rischio di malattia di circa tre volte, tuttavia rimane da determinare se, almeno in alcuni casi, la depressione possa rappresentare un sintomo precoce di malattia di Alzheimer.

In realtà sono stati anche individuati possibili fattori protettivi tra i quali rivestono un ruolo significativo gli estrogeni e gli antinfiammatori. In particolare alcuni studi epidemiologici (Correa et al., 2010) hanno dimostrato che, nelle donne che avevano assunto estrogeni dopo la menopausa, il rischio di contrarre la malattia di Alzheimer era minore rispetto alle altre. Sono stati ipotizzati vari meccanismi attraverso i quali gli estrogeni possono migliorare la performance cognitiva: aumento dell'attività dell'acetilcolinotransferasi, stimolazione della rigenerazione neuronale e regolazione della funzione sinaptica a medio-lungo termine. Inoltre sembra che gli estrogeni siano coinvolti nella riduzione della produzione dell'ApoE e migliorino l'efficienza dei trattamenti farmacologici nelle forme lievi e moderate di malattia di Alzheimer. Anche un'altra famiglia di farmaci, gli antinfiammatori, sembra essere coinvolta nella riduzione del rischio di sviluppare la malattia. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che soggetti affetti da artrite reumatoide, che assumono quotidianamente FANS (farmaci antiinfiammatori non steroidei) l'incidenza della malattia di Alzheimer è più bassa rispetto al resto della popolazione (Correa et al., 2010). Controversa appare invece la questione inerente il fumo, poiché alcuni studi riportano un'associazione negativa tra il fumo e la malattia di Alzheimer, altri invece non hanno rivelato alcuna associazione tra i due, sottolineando l'effetto nocivo del fumo sull'apparato cardiovascolare e respiratorio. Secondo alcuni ricercatori (Loperz et al., 2000) il ruolo protettivo della nicotina si traduce in una up-regulation dei recettori nicotinici dell'acetilcolina con possibile effetto positivo sulle funzioni cognitive; questa ipotesi è stata suggerita da studi sperimentali, i quali asseriscono che sostanze in grado di stimolare i recettori nicotinici migliorano l'apprendimento e la memoria in vari modelli animali di deficit cognitivo. Ovviamente è lontana l'idea di suggerire a un malato di Alzheimer di fumare poiché se da un lato le sue performance cognitive potrebbero in qualche modo migliorare, dall'altro l'effetto negativo del fumo è noto a tutti, rappresentando la prima causa di morte prematura nei paesi industrializzati. Secondo due nuovi studi, il consumo di alimenti ricchi di vitamine C ed E (potenti antiossidanti), potrebbe ridurre il rischio di Alzheimer. A testare le proprietà antidemenza della vitamina C, contenuta in frutta e verdura fresche, sono stati i ricercatori dell'Erasmus Medical Center di Rotterdam. Inoltre un'attività fisica e regolare non solo mantiene in forma il nostro corpo, ma aiuta a prevenire il declino mentale e ad allontanare l'Alzheimer.

5.5 Diagnosi della demenza tipo AD

Riconoscere e classificare correttamente una demenza è una delle operazioni di diagnosi clinica più delicate che ci possano essere, perché essa si presenta con una ampia variabilità di quadri clinici tanto che anche all'interno della stessa condizione etiologica (ad esempio la malattia di Alzheimer) può esservi una certa eterogeneità. Ciò perché le manifestazioni cliniche della demenza nel singolo paziente dipendono dall'interazione fra danno neurobiologico e numerose altre variabili come la personalità, la storia personale il (livello educativo e culturale), stato globale di salute, situazione familiare e sociale, cosa che rende ogni paziente un unico, magari simile, ma mai identico a nessun altro.

Indipendentemente da tali problematiche, la diagnosi di demenza deve essere effettuata seguendo le indicazioni dei criteri accettati a livello internazionale (Sciarna e Felicioni, 2009): per l'Alzheimer i più usati sono i criteri del DSM-IV TR e i criteri specifici del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, mentre per la demenza vascolare si ricorre a più criteri diagnostici DSM-IV TR, ICD-10, ADDTC (Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers) e quelli più specifici del NINDSAIREN (National Institute for Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences).

Criteri per la diagnosi di AD secondo il DMS IV TR :

A Criteri per DMS IV TR per la diagnosi di demenza;

B Il decorso è caratterizzato da insorgenza graduale e declino continuo delle facoltà cognitive.

C I deficit cognitivi dei criteri non sono dovuti ad alcuno dei seguenti fattori:

1. altre condizioni del sistema nervoso centrale che causano deficit progressivi della memoria e delle facoltà cognitive (per esempio, malattia cerebrovascolare, malattia di Parkinson, malattia di Huntington, ematoma subdurale).
2. affezioni sistemiche che sono riconosciute come causa di demenza (per esempio, ipotiroidismo, deficit di vitamina B12 o acido folico, deficit di Magnesio, ipercalcemia, neurosifilide, infezione HIV);
3. affezioni indotte da sostanze.

D. Il disturbo non risulta meglio giustificato da un altro disturbo dell'Asse I (per esempio, Disturbo Depressivo Maggiore, Schizofrenia).

1. Con insorgenza Precoce: se l'insorgenza è all'età di 65 anni o prima.
2. Con insorgenza Tardiva: se (insorgenza è dopo 65 anni di età)
3. Con Delirio: se i deliri sono la caratteristica dominante.
4. Con Umore Depresso: l'umore depresso (inclusi i quadri che soddisfano pienamente i criteri sintomatologici per Episodio Depressivo Maggiore) è la caratteristica dominante.

La diagnosi di AD secondo il NINCDS-ADRDA

I. Criteri per la diagnosi clinica di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE:**

1. Demenza stabilita dall'esame clinico e documentata dal Mini Mental Test, o da esami similari.
2. Deficit di due o più aree cognitive
3. Peggioramento progressivo della memoria e di altre funzioni cognitive
4. Assenza di disturbi della coscienza
5. Esordio tra i 40 ed i 90 anni, più spesso dopo i 65
6. Assenza di patologie sistemiche o di altre malattie cerebrali responsabili di deficit cognitivi progressivi

II. La diagnosi di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE è suffragata da:**

1. Deterioramento progressivo di funzioni cognitive specifiche quali il linguaggio (afasia), la gestualità (aprassia), e la percezione (agnosia).
2. Compromissione delle attività quotidiane e dei "pattern" di comportamento
3. Familiarità positiva per analoghi disturbi, particolarmente se confermati dal punto di vista neuropatologico
4. Conferme strumentali di: normalità dei reperti liquorali standard, normalità o aspecificità dell'EEG, atrofia cerebrale alla TAC cerebrale con documentata progressione dopo osservazioni seriate

III. Altre caratteristiche cliniche in accordo con la diagnosi di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE**

includono, dopo l'esclusione di cause alternative di demenza:

1. "Plateau" nella progressione della malattia.
2. Associazione di depressione, insonnia, incontinenza sfinterica, disturbi della percezione, reazioni verbali emotive o fisiche di tipo catastrofico, disturbi sessuali, calo ponderale.
3. Altre anomalie neurologiche, specialmente nei casi con malattia in fase avanzata, comprendenti segni motori quali ipertono, mioclonie o disturbi della marcia.
4. Crisi epilettiche nella malattia in fase avanzata.
5. TAC encefalica normale per l'età.

IV Caratteristiche che rendono la diagnosi di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE incerta:**

1. Esordio acuto, apoplettiforme.
2. Presenza di segni neurologici focali quali emiparesi, deficit sensitivi, alterazioni campimetriche ed incoordinazione nelle fasi precoci della malattia
3. Crisi o disturbi della marcia all'esordio o nelle fasi iniziali del decorso della malattia

V La diagnosi clinica di *malattia di Alzheimer* **POSSIBILE:**

1. Può essere formulata sulla base di una sindrome demenziale, in assenza di disturbi neurologici, psichiatrici o sistemici in grado di causare demenza, e in presenza di variazioni dell'esordio, delle modalità di presentazione o del decorso
2. Può essere formulata in presenza di una patologia neurologica o sistemica concomitante, possibilmente responsabile di demenza, non considerata tuttavia la vera causa della demenza
3. Dovrebbe essere utilizzata nella ricerca quando un deficit cognitivo isolato, progressivo e grave sia evidenziabile in assenza di altre cause identificabili

VI I criteri per la diagnosi di malattia di Alzheimer DEFINITIVA sono:

1. I criteri clinici di malattia di Alzheimer PROBABILE
2. documentazioni neuropatologiche biottiche o autoptiche.

I criteri vengono identificati attraverso un percorso in due fasi successive: una fase di screening e una fase di conferma (Milne et al., 2008). La fase di screening è gestita dal medico curante ed è finalizzata ad individuare il sospetto diagnostico fornito dai familiari accertati di disturbi mnesici o comportamentali, per valutare l'eventuale presenza di demenze reversibili ed effettuare una prima indagine differenziale. E' effettuata mediante anamnesi completa del paziente, esame fisico e neurologico per individuare segni focali, valutazione cognitiva (Mini Mental State Examination -MMSE, Milan Overall Dementia Assessment – MODA, Severe Impairment Battery-SIB), non cognitiva, comportamentale/affettivo (NeuroPsychiatric Inventory-NPI, Cornell Scale, Geriatric Depression Scale-GDS) e funzionale (Barthel Index, Bedford Alzheimer Assessment Nursing Scale – BAANS, Basic Activity of Daily Living – BADL, Instrumental Activity of Daily Living – IADL, Advanced Activity of Daily Living – AADL) e valutazione dello stadio della demenza tramite il Clinical Dementia Rating (CDR). Non esiste comunque una batteria di test standardizzata. Vengono inoltre effettuati test di laboratorio (emocromo completo, VES, elettroliti sierici, azotemia, glicemia, creatinemia, uricemia, bilirubinemia, SGOT, SGPT, gGT, elettroforesi proteica), valutazione della funzionalità tiroidea, dosaggio vitamina B12 e folati, sierologia per la sifilide, analisi delle urine), esami strumentali (ecg, Rx Torace) e neuroimaging (TAC, RMN).

Alla fase di screening segue una fase diagnostica per verificare l'effettiva presenza di una e più sicura eziologia. Ciò attraverso neuroimaging funzionale (PET, SPECT), puntura lombare ed elettroencefalogramma ed una batteria di test neuropsicologici sulle funzioni cognitive (NPS).

La diagnosi differenziale è spesso molto difficile, tuttavia uno strumento che permette con buona approssimazione di discriminare tra le due patologie è la scala ischemica di Hachinski (HIS).

Molto complessa è anche la diagnosi differenziale tra demenza vascolare e depressione, tra le quali vi è una ampia sovrapposizione causa di frequenti problemi gestione clinica.

L'esatto significato del disturbo depressivo che compare nelle fasi iniziali della demenza è tuttora incerto; variabili biologiche sono probabilmente coinvolte, anche se aspetti di personalità, insight di malattia, livello funzionale, variabili sociali ed ambientali sono associate variamente alla comparsa di sintomi depressivi.

5.5.1 Test cognitivi nella valutazione del paziente AD

Uno dei test maggiormente utilizzati nella pratica clinica è il **Mini Mental State Examination** è una prova che, in pochi minuti, può dare delle interessanti informazioni diagnostiche sullo stato cognitivo del paziente. Il MMSE è uno strumento ideato per valutare, in ambito clinico, le capacità cognitive del soggetto; la sua somministrazione richiede 10-15 minuti. È costituito da 11 item tramite i quali vengono valutate in modo semplice le varie funzioni cognitive, ed in particolare l'orientamento temporale e spaziale, la memoria immediata (memoria di fissazione o registrazione), l'attenzione e calcolo, la memoria di richiamo e il linguaggio (denominazione, ripetizione, comprensione orale, comprensione scritta e generazione di frase

scritta). Parte delle informazioni possono essere raccolte sotto forma di colloquio. Il valore massimo del test è 30, sono considerati normali punteggi uguali o superiori a 24, valori tra 23-18 indicano una demenza in fase iniziale, tra 17-10 demenza moderata e minori di 10 una demenza grave, sebbene all'esordio un paziente possa anche avere un valore di MMSE pari a 24 e poi peggiore con il progredire della malattia. Questo test ha nel suo stesso pregio, la brevità, anche il suo limite; infatti non permette una completa valutazione delle funzioni cognitive e non è pertanto sufficientemente sensibile alle fasi iniziali della demenza. In particolare, il MMSE è influenzato dal livello di educazione e dalla scolarità del soggetto e per questo motivo si raccomanda l'uso di punteggi corretti. Questo test presenta alcuni svantaggi per lo screening delle demenze vascolari, infatti, è molto più sensibile per i deficit corticali che per quelli sottocorticali per i quali il **MODA** ha una maggiore sensibilità. Rispetto al MMSE è più accurato in quanto ispeziona maggiori domini cognitivi. Il MODA è composto da tre sezioni. La prima sezione riguarda l'orientamento e distingue tra orientamento temporale, spaziale, personale e familiare. La seconda sezione consiste in una scala di autonomia quotidiana, le domande di questa scala vengono rivolte ad un congiunto o ad un convivente. La terza ed ultima sezione è quella più propriamente testistica. Questa sezione è composta da nove test che indagano abilità cognitive quali l'attenzione, l'intelligenza verbale, la memoria, la fluenza verbale, la percezione e l'identificazione degli stimoli.

L'**Indice di Barthel** rappresenta uno degli strumenti di valutazione della funzione fisica più noti, soprattutto in ambito riabilitativo. Fornisce un punteggio indicativo delle capacità del soggetto di alimentarsi, vestirsi, gestire l'igiene personale, lavarsi, usare i servizi igienici, spostarsi dalla sedia al letto e viceversa, deambulare in piano, salire e scendere le scale, controllare la defecazione e la minzione. Il punteggio assegnato per ogni funzione può essere 15, 10, 5 o 0. Per esempio, vengono assegnati 10 punti se il soggetto si alimenta autonomamente e 5 punti se richiede aiuto (per esempio tagliare il cibo). Il punteggio massimo è assegnato solo se il paziente esegue il compito in modo completamente indipendente, senza la presenza di personale d'assistenza. Il punteggio massimo totale è 100 ed indica l'indipendenza in tutte le attività di base della vita quotidiana.

La **BANSS** fornisce informazioni sul grado di compromissione cognitiva (linguaggio e contatto oculare) funzionale (abbigliamento, alimentazione, deambulazione) e sulla presenza di sintomi patologici (alterazioni del ciclo sonno-veglia, rigidità muscolare/contratture). La BANSS consente di ottenere informazioni sulle condizioni cognitivo/funzionali del paziente finché quest'ultimo raggiunge lo stato vegetativo. La compilazione della BANSS si esegue utilizzando le informazioni del personale di assistenza e l'esame obiettivo del paziente. Il punteggio ottenuto oscilla tra 7 e 28 ed è direttamente proporzionale al livello di gravità della malattia.

La scala delle **IADL** valuta la capacità di compiere attività che vengono normalmente svolte anche da soggetti anziani e che sono considerate necessarie per il mantenimento della propria indipendenza. La scala è usualmente utilizzata nella forma dicotomica, che prevede per ogni item due sole possibili risposte: "indipendente" (1) e "dipendente" (0). E' necessario tuttavia considerare i singoli item, in quanto sono questi che contribuiscono a creare il profilo della disabilità dell'anziano. Le IADL sono fortemente influenzate dalla

funzioni cognitive, anche se dipendono in buona parte dalla situazione ambientale, dalle abitudini del soggetto (ruolo sociale o familiare) e dalle funzioni fisiche. L'autonomia in queste abilità definisce la possibilità di un individuo di vivere in modo autonomo al proprio domicilio.

Le **BADL** sono maggiormente influenzate dalle funzioni fisiche che da quelle cognitive; nella demenza, infatti, si assiste generalmente ad una rapida perdita delle IADL, mentre per la maggior parte delle BADL il paziente può rimanere a lungo totalmente autosufficiente. Con l'aggravamento del deficit cognitivo anche l'autonomia nelle attività di base viene progressivamente a perdersi, fino alla completa disabilità nelle fasi più avanzate. Gli strumenti che misurano le BADL e le IADL sono però poco sensibili ai disturbi funzionali di soggetti nelle fasi iniziali della demenza, particolarmente quando si tratta di individui con estesi interessi sociali e relazionali. Per ovviare a questo aspetto è stato introdotto il concetto di attività avanzate della vita quotidiana (Advanced Activity of Daily Living - **AADL**), per rappresentare quelle più complesse ed impegnative, quali gli hobby e le attività ricreative, i viaggi, la partecipazione ad attività sociali o culturali. Queste abilità non sono essenziali per mantenere l'indipendenza e sono fortemente influenzate, oltre che dalle funzioni cognitive, dalla salute fisica, dal tono dell'umore, da variabili culturali e motivazionali; inoltre esiste in questo ambito una ampia variabilità individuale. Nonostante questi limiti, l'attenta valutazione delle AADL permette di svelare quelle modificazioni del comportamento che, benché di per sé non indicative di decadimento cognitivo, devono far sospettare la presenza di una demenza nelle fasi iniziali. Un altro problema degli strumenti abitualmente in uso è il cosiddetto "effetto pavimento" nella valutazione delle BADL, quando al livello più basso delle usuali scale funzionali vengono compresi individui con gradi anche molto diversi di disabilità.

La **Geriatric Depression Scale** è una tra le più diffuse scale per la valutazione di sintomi depressivi. E' uno strumento composto da 30 items, che esclude la rilevazione dei sintomi somatici e di sintomi psicotici. Le risposte sono di tipo binario (si/no) e questo rende lo strumento di più facile utilizzo nei pazienti anziani con deficit cognitivo. Il punteggio varia da 0 (non depresso) a 30 (massima gravità della depressione), con un cut-off individuato a 11 per la presenza di sintomi depressivi clinicamente rilevanti. La gravità della depressione viene quindi così rappresentata: da 0 a 10 assente, da 11 a 16 depressione lieve moderata, 17 o superiore depressione grave.

Cornell Scale for Depression in Dementia (CDS) è una scala appositamente disegnata per la valutazione dei sintomi depressivi nei pazienti dementi. La Cornell Scale utilizza una serie standardizzata di item che sono rilevati attraverso un'intervista ad una persona che conosce il paziente (familiare o operatore) ed il colloquio semistrutturato con il paziente. Si tratta quindi di uno strumento osservazionale, che non richiede quindi la risposta diretta del paziente a domande formulate in modo standardizzato. La scala si compone di 19 item, con risposte che hanno un punteggio graduato da 0 (sintomo assente) a 2 (sintomo severo). E' una delle poche scale validate in popolazioni di soggetti dementi, anche di entità moderato-severa (*Ballard et al, JAGS, 1997;45:123-124*).

Clinical Dementia Rating Scale necessita di informazioni raccolte da un familiare o operatore che conosce il soggetto e di una valutazione delle funzioni cognitive del paziente con particolare riferimento ai seguenti

aspetti: 1) memoria; 2) orientamento temporale e spaziale; 3) giudizio ed astrazione; 4) attività sociali e lavorative; 5) vita domestica, interessi ed hobby; 6) cura della propria persona. In base al grado di compromissione viene assegnato un punteggio variabile tra 0 - 0.5 - 1 - 2 - e 3; 0= normale; 0.5= dubbia compromissione; 1 compromissione lieve; 2= compromissione moderata; 3= compromissione severa. Ogni aspetto va valutato in modo indipendente rispetto agli altri. La memoria è considerata categoria primaria; le altre sono secondarie. Se almeno tre categorie secondarie ottengono lo stesso punteggio della memoria, allora il CDR è uguale al punteggio ottenuto nella memoria.

Se tre o più categorie secondarie ottengono un valore più alto o più basso della memoria, allora il punteggio della CDR corrisponde a quello ottenuto nella maggior parte delle categorie secondarie. Qualora due categorie ottengano un valore superiore e due un valore inferiore rispetto a quello ottenuto dalla memoria, il valore della CDR corrisponde a quello della memoria. La scala è stata successivamente estesa per classificare in modo più preciso gli stadi più avanzati della demenza (Hayman et al, 1987). I pazienti possono essere perciò classificati in stadio 4 (demenza molto grave) quando presentano severo deficit del linguaggio o della comprensione, problemi nel riconoscere i familiari, incapacità a deambulare in modo autonomo, problemi ad alimentarsi da soli, nel controllare la funzione intestinale o vescicale. Sono classificati in stadio 5 (demenza terminale) quando richiedono assistenza totale perché completamente incapaci di comunicare, in stato vegetativo, allettati, incontinenti.

L'**NPS** in aggiunta al test del MMSE eseguito in fase di screening, include:

1. Test delle parole di Rey a richiamo immediato e differito (memoria verbale a breve e lungo termine).
2. Test di memoria visiva immediata (memoria visiva a breve termine).
3. Rievocazione della figura complessa di Rey-Osterrieth (memoria visuo-spaziale a lungo termine); Double Barrage test (abilità di attenzione visiva); Stroop test ridotto (abilità attentive superiori); Copia di disegni a mano libera e copia con elementi di programmazione (prassia costruttiva semplice); Copia della figura complessa di Rey-Osterrieth (prassia costruttiva complessa); Matrici colorate progressive di Raven 47 (abilità di ragionamento logico-induttivo); Fluidità verbale fonologica e semantica (fluenza verbale); Test di riconoscimento di volti di Bentos (prosopognosia).

Nell'**HIS** per la diagnosi differenziale tra demenza vascolare e Alzheimer vengono assegnati 1 o 2 punti per ogni elemento presente all'anamnesi o all'esame obiettivo del paziente. Un punteggio totale >7 è indicativo di Demenza vascolare, mentre un punteggio totale <4 è indicativo della presenza di demenza.

5.5.2 Diagnostica neuroradiologica nella diagnosi di Alzheimer

Le tecniche di neuroradiologia come la TC e la RM, hanno un ruolo importante nella diagnosi di AD. Esse non permettono da sole di formulare la diagnosi, ma consentono di escludere altre malattie responsabili di sintomi simili, come ad esempio la demenza vascolare. Studi longitudinali condotti con RM hanno mostrato come l'atrofia in specifiche aree cerebrali come il lobo temporale mediale (Jack et al., 2004) o in regioni più ampie (Wang et al., 2002), correli con un declino cognitivo (Jack et al., 2004). Più nello specifico l'AD causa atrofia nelle aree limbiche (Pearson, Esiri, Hiorns, Wilcock & Powell, 1985) e nel lobo temporale mesiale (corteccia entorinale e ippocampo), determinando una diminuzione del volume ippocampale di circa

il 4-6% annuo (Jack et al., 2000). Altre metodiche utili alla diagnosi di AD sono le tecniche di neuroimaging funzionale, come la SPECT e la PET che studiano rispettivamente il flusso di sangue e il metabolismo del glucosio, nelle diverse aree cerebrali (Petrella, Coleman, & Doraiswamy, 2003). Grazie alla PET sono stati osservati cambiamenti nelle aree parieto-temporali e frontali della corteccia in pazienti con AD con il risparmio della corteccia visiva e senso-motoria.

Il pattern di riduzione del metabolismo del glucosio può, in questi pazienti, coinvolgere un solo emisfero o entrambi (Nordberg, 2007). Anche tramite la SPECT è possibile evidenziare le stesse modificazioni cerebrali ottenibili con la PET, nonostante la risoluzione spaziale e l'accuratezza siano diverse (Messa et al., 1994). La SPECT, per l'ampia disponibilità delle attrezzature e il costo limitato dell'esame, è stata considerata, sin dalle sue prime applicazioni cliniche, uno strumento promettente per la diagnosi di AD. La dimostrazione di alterazioni funzionali cerebrali caratteristiche, anche nelle fasi precoci della malattia, ha avuto un ruolo importante nella promozione delle applicazioni diagnostiche della SPECT. Il quadro funzionale dimostrato con la tecnica SPECT è quello di una riduzione patologica del flusso ematico cerebrale a livello delle aree posteriori del cervello, in particolare dei lobi parietali. Queste alterazioni funzionali, riscontrate nell'AD, si differenziano da quelle riscontrate in altri tipi di demenza degenerativa (demenza fronto-temporale o FTD), nella quale sono coinvolte strutture frontali e temporali del cervello (Nordberg, 2007). Nell'ambito delle malattie neurologiche su base degenerativa e associate a demenza, le tecniche di neuroimaging funzionale consentono di avere un elemento supplementare per confermare la diagnosi clinica. Studi PET e SPECT con metodi di attivazione permettono di misurare variazioni di parametri funzionali (perfusione ematica) mentre i soggetti sono impegnati in compiti cognitivi. Studi che utilizzano la PET funzionale, supportano, ad esempio, il ruolo dell'ippocampo, della corteccia mediale e di quella frontale in compiti di memoria episodica (Bäckman et al., 1999). Recenti studi di attivazione con fMRI, in cui il soggetto svolge un compito di memoria, dimostrano una minore attivazione funzionale nei soggetti con MCI e con 20 AD rispetto ai controlli nelle regioni temporali mediali (Iacoboni, Baron, Frackowiak, Mazziotta & Lenzi, 1999). Pariente e collaboratori (2005) hanno confrontato la prestazione di 12 pazienti con AD in fase iniziale e quella di 17 soggetti di controllo in un compito di associazione volti-nomi. Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a quattro sessioni durante l'fMRI (due di studio e due di test). Durante le fasi di studio si chiedeva ai pazienti di associare nomi a volti, nella fase di test, invece, venivano ripresentate le stesse fotografie con quattro nomi da cui scegliere quello corretto. I risultati hanno messo in evidenza che i soggetti di controllo erano più veloci ed accurati nel dare le risposte, inoltre era presente un'ipoattivazione dell'ippocampo nell'emisfero di destra nei pazienti durante la codifica e il riconoscimento e un'iperattivazione delle regioni frontali e parietali (a destra durante la codifica e a sinistra durante il riconoscimento), ad indicare probabilmente un reclutamento di risorse cognitive o un maggior sforzo cognitivo per massimizzare le prestazioni delle attività. Anche van Paasschen e collaboratori (2009) hanno utilizzato un compito di associazione volti-nomi su un singolo paziente con MCI amnestico. Dopo otto sessioni di riabilitazione cognitiva si è evidenziato una maggiore attivazione delle aree frontali durante il processo di codifica, con una prestazione migliore durante il compito di associazione volti-nomi. Dato che tali regioni sono impegnate durante compiti di memoria

semantica (Logan, Sanders, Snyder, Morris & Buckner, 2002), gli autori pensano che il trattamento cognitivo possa aver aiutato l'uso spontaneo di strategie che hanno attivato aree cerebrali compensatorie. Grady e collaboratori (2003) hanno misurato l'attività neurale durante compiti di memoria semantica ed episodica in 12 pazienti con AD lieve e 12 soggetti di 21 controllo. Il gruppo di controllo ha mostrato una maggiore attivazione nella corteccia prefrontale e temporale dell'emisfero sinistro in entrambi i compiti presentati. I pazienti, invece, hanno mostrato un'attivazione della corteccia dorso laterale prefrontale e posteriore bilateralmente. L'attività in queste regioni è stata correlata con prestazioni migliori nei pazienti a entrambi i compiti. Ciò fornisce la prova più diretta fino ad oggi che i pazienti con AD possono utilizzare ulteriori risorse neurali nella corteccia prefrontale, presumibilmente quelle funzioni esecutive di mediazione, per compensare le perdite attribuibili al processo degenerativo della malattia.

5.5.3 La diagnostica neurofisiologica nella demenza di Alzheimer

Attraverso l'analisi EEG si sono potuti osservare almeno tre effetti caratteristici dell'AD:

- (1) rallentamento globale della elettrogenesi cerebrale.
- (2) riduzione della complessità dei segnali;
- (3) problemi di sincronia (Dauwels, Vialette & Cichcki, 2011).

Molti studi hanno dimostrato un rallentamento dell'attività EEG (ad es., van der Hiele et al., 2007; Schreiter Gasser, Rousson, Hentschel, Sattel, & Gasser, 2008): l'AD è associata ad un aumento di potenza nelle bande a bassa frequenza (quali i ritmi delta e theta, con frequenza compresa tra 0.5 e 4-8 Hz, rispettivamente) e una riduzione di potenza spettrale nelle bande a media e alta frequenza (quali i ritmi alpha e beta, con frequenza compresa tra 8-13 e 13-30 Hz, rispettivamente, ed il ritmo gamma, con un vasto intervallo di frequenze caratteristiche, tra 30-100 Hz). Numerosi studi hanno, inoltre, riportato in pazienti con AD un decremento della sincronizzazione EEG in condizioni di riposo (EEG spontaneo; Babiloni et al., 2009a; Babiloni et al., 2009b). La perdita di sincronia è spesso attribuita a disconnessioni funzionali della neocorteccia, non solo a una perdita di neuroni corticali. Attraverso potenziali sensoriali evocati da stimolazione luminosa intermittente, gli autori hanno potuto evidenziare le differenze tra pazienti AD e controlli all'interno di due intervalli temporali (tra 200 e 400 ms, e tra 800 e 1000 ms), in corrispondenza di siti di registrazione fronto-parietali, supportando l'ipotesi che i cambiamenti frontali e parietali contribuiscono ai problemi di memoria di lavoro che caratterizzano la malattia.

5.6 La terapia farmacologica

Allo stato delle attuali conoscenze per la terapia farmacologica dell'AD non si dispone di un trattamento causale, consistente cioè nella rimozione della causa della malattia, ma soltanto di farmaci "sintomatici", finalizzati cioè all'attenuazione delle manifestazioni cliniche della patologia. I farmaci, denominati inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChEI), sono stati approvati a livello internazionale per il trattamento dell'AD nelle fasi lievi-moderate. Attualmente in Italia sono disponibili il donepezil (Rogers & Friedhoff, 1996), la galantamina (Wilkinson, Schwale & Hammond, 2001) e la rivastigmina (Corey-Bloom, Anand & Veach, 1998), dispensati gratuitamente dal sistema sanitario nazionale, limitatamente alle fasi lievi e moderate della patologia e previa valutazione in centri specializzati (Unità di Valutazione Alzheimer U.V.A.). Il presupposto teorico del loro impiego risiede nella carenza cerebrale della sostanza chimica acetilcolina, coinvolto nei compiti di memoria. L'acetilcolina invia messaggi da una cellula all'altra e, dopo aver terminato il suo compito, viene distrutta dall'enzima acetilcolinesterasi in modo che non si accumulino tra le cellule. Gli AChEI, che bloccano l'attività dell'acetilcolinesterasi, mantengono la disponibilità cerebrale di acetilcolina e possono compensare, ma non arrestare, la distruzione delle cellule provocata dalla malattia. Possono migliorare alcuni sintomi cognitivi, quali la memoria e l'attenzione (Birks, 2006) e comportamentali, quali apatia, agitazione e allucinazioni, ma questa loro capacità diminuisce con il progredire della malattia (Fagherazzi, Stefinlongo & Brugiolo, 2009). Non sono mancati, però i dubbi sul reale valore di questi farmaci. Nel 2004 è stato pubblicato su *Lancet* lo studio AD 2000 (Courtney et al., 2004) finanziato dal servizio sanitario britannico. Il gruppo studiato era di 565 pazienti con AD di grado lieve-moderato, di cui 282 trattati con donepezil e 283 con placebo. Il confronto donepezil vs. placebo non dimostrava differenze significative per il rischio di istituzionalizzazione, regressione di disabilità e altri outcome (sintomi comportamentali, costi assistenziali e tempo non retribuito impiegato dai caregivers per l'assistenza al malato). Tale studio confermava che l'uso del donepezil produce un miglioramento nei punteggi delle scale cognitive e funzionali, ma metteva in dubbio la rilevanza clinica di questi outcome e l'utilità, in termini di costo-efficacia, del farmaco. Il dibattito si è esteso poi all'intera classe degli AChEI vista l'assenza di differenze di efficacia tra le molecole (Akintade, Zaiac, Ieni & McRae, 2004). In generale gli AChEI sembrano essere ben tollerati, ma non hanno lo stesso effetto in tutti i pazienti. Metà circa dei pazienti non risponde a questo trattamento, fra i responders una parte mostra un miglioramento della funzionalità cognitiva, ma dopo poco tempo il loro declino cognitivo riprende allo stesso ritmo che avrebbe avuto se non si fosse somministrato il farmaco (Boccardi, 2007).

Da quanto esposto risulta evidente il motivo per cui negli ultimi anni è diventato sempre più crescente l'interesse verso interventi non-farmacologici nell'ambito delle demenze, anche in associazione al trattamento farmacologico.

Diversi studi hanno infatti dimostrato benefici maggiori a livello cognitivo quando il trattamento farmacologico viene associato ad un trattamento riabilitativo (ad esempio Onder *et al.*, 2005; Matsuda, 2007). L'obiettivo di questi approcci è quello di rallentare il peggioramento dei deficit cognitivi comportamentali e di migliorare la qualità della vita.

Tuttavia le metodiche riabilitative tradizionali nell'ambito delle demenze seppur in grado di facilitare il ripristino di alcune componenti, non sono sufficienti a porre una barriera alla regressione funzionale. Ed è proprio all'interno di tale contesto che diventano allora necessarie strategie complementari (Kang, 2009). In un simile contesto si inserisce bene l'utilizzo di strumenti di stimolazione cerebrale (Nitsche, 2008). In generale, lo scopo di queste tecniche è quello di potenziare l'eccitabilità neuronale (N.Yozbatiran, 2009). Nello specifico, negli ultimi anni anche nei pazienti con disfunzioni neurologiche sono state utilizzate la stimolazione transcranica in corrente diretta e la stimolazione magnetica transcranica (G.G. Turrigiano, 2004). A tal proposito risultati interessanti derivano da uno studio di Boggio e collaboratori (2009) su 10 pazienti (4 uomini e 6 donne) con diagnosi di AD è stato dimostrato che la tDCS di tipo anodico migliora le prestazioni dei soggetti in compiti di memoria di riconoscimento visivo. I soggetti erano sottoposti a 3 condizioni sperimentali: ricevevano una corrente di intensità di 2 mA per 30 minuti con l'elettrodo anodico posto in corrispondenza della corteccia temporale sinistra nella prima condizione, sulla corteccia prefrontale dorso laterale sinistra nella seconda condizione e infine la terza condizione era quella simulata o di controllo. Durante la stimolazione erano valutati: l'attenzione selettiva tramite il test di Stroop, la memoria di lavoro con test di Digit Span e, infine, la memoria di riconoscimento con compiti di memoria visiva (i soggetti guardavano delle figure su uno schermo e successivamente venivano presentate altre o le stesse figure e i pazienti dovevano indicare se fossero già apparse in precedenza).

I risultati dell'esperimento hanno evidenziato che dopo la tDCS (sia della corteccia temporale sinistra, sia di quella prefrontale dorsolaterale sinistra) avveniva un miglioramento nei compiti di memoria di riconoscimento visivo non riconducibili ad effetti dell'attenzione in quanto ne nel test di Stroop ne il Digit Span avevano ottenuto risultati significativi. I ricercatori hanno ipotizzato che la stimolazione anodica agisca da facilitatore, in quanto l'area cerebrale stimolata diventa più reattiva nella fase di codifica del materiale.

PARTE QUINTA
SEZIONE SPERIMENTALE

Effetti cognitivi e neurofisiologici di cicli ripetuti di
tDCS nella Demenza di Alzheimer (AD)

5.7 Obiettivi

Obiettivo del presente studio è stato quello di indagare attraverso l'utilizzo di una estesa valutazione neurocognitiva e neurofisiologica l'efficacia della stimolazione transcranica a correnti dirette (tDCS) associata al trattamento farmacologico, nel mantenere stabili per un periodo di tempo lungo 8 mesi le performance cognitive in un gruppo di 8 pazienti affetti da AD di grado moderato rispetto, ad un gruppo di controllo di 8 soggetti AD a cui è stata somministrata la stimolazione Sham (placebo) in associazione alla terapia farmacologica.

In questo studio è stato impiegato un disegno sperimentale ABA': fase di pre-test (A), training (B), post-test (A'). Tutti i soggetti sono stati sottoposti a 10 cicli mensili di tDCS anodica sulle aree fronto-temporali di sinistra ad un intensità di 2 mA per una durata di 20 minuti al giorno. La durata complessiva della sperimentazione è stata di 8 mesi.

5.7.1 Partecipanti

Sedici pazienti 6 donne e 10 uomini con diagnosi di AD probabile di grado lieve-moderato, con età media di 74 anni e scolarità di 8 anni, sono stati selezionati presso il centro di Unità di Valutazione Alzheimer (U.V.A.) della provincia di residenza. Anche in questo caso, come nei precedenti studi, le diagnosi incontravano i criteri del DSM-IV (Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali, 1994; American Psychiatric Association, 1994) e del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association; McKhann *et al.*, 1984; Dubois *et al.*, 2007). Tutti i pazienti sono stati esaminati e valutati sulla base: (a) della documentazione neuroradiologica (TC cranio) che ha evidenziato segni di atrofia cortico-sottocorticale, più evidenti in sede insulare, e atrofia ippocampale simmetrica con dilatazione del corno temporale dei ventricoli laterali, con quadri di entità variabile nei vari pazienti; (b) della visita geriatrica presso l'U.V.A.; (c) dei sintomi neuropsicologici evidenziabili dai test cognitivi utilizzati per la valutazione di tale patologia.

Tutti i pazienti erano in trattamento farmacologico con AChEI. Il campione è stato diviso in maniera random in due gruppi: il primo è stato sottoposto al trattamento combinato di tDCS anodica e terapia farmacologica. Il secondo gruppo ha ricevuto la tDCS sham in associazione alle cure farmacologiche.

Entrambi i gruppi sono stati confrontati prima del trattamento e subito dopo sulla base della: (a) valutazione neuropsicologica; (b) analisi dell'attività elettricocorticale (EEG).

L'arruolamento dei pazienti è stato condotto nel rispetto dei seguenti criteri di inclusione:

- Età compresa tra i 65 e 74 anni .
- Durata di malattia non inferiore a 2 anni
- Diagnosi di malattia accertata dal centro UVA di riferimento
- In trattamento farmacologico da almeno 1 anno
- Punteggio MMSE compreso tra 14 e 20 e punteggio Moda compreso tra 72 e 82
- Assenza o concomitanza di altre patologie neurodegenerative .

E dei seguenti criteri di esclusione:

- Malattia in stadio severo
- Pregressi di interventi neurochirurgici
- Presenza di protesi metalliche
- Presenza di Pace maker o aritmie cardiache
- Assenza di diagnosi di epilessia

5.7.2 Protocollo di valutazione cognitiva

Per valutare le abilità cognitive dei pazienti sono stati somministrati i seguenti test cognitivi:

Mini Mental State Evaluation (MMSE) (Folstein, Folstein & Mc Hugh, 1975; versione italiana in Magni, Binetti, Bianchetti, Rozzini & Trabucchi, 1996). Questo test permette di ottenere un punteggio globale del livello di compromissione cognitiva valutando, diverse aree cognitive.

Il test è costituito da trenta *item* , che fanno riferimento a sette aree cognitive differenti:

- orientamento nel tempo
- orientamento nello spazio
- registrazione di parole
- attenzione e calcolo
- rievocazione
- linguaggio
- prassia costruttiva

Il punteggio totale è compreso tra un minimo di 0 ed un massimo di 30 punti. Un punteggio uguale o inferiore a 18 è indice di una grave compromissione delle abilità cognitive; un punteggio compreso tra 18 e 24 è indice di una compromissione da moderata a lieve, un punteggio pari a 25 è considerato borderline, da 26 a 30 è indice di normalità cognitiva.

Inoltre è stato costruito essenzialmente sulla base dei sintomi di patologie a esordio funzionale (come ad esempio la malattia di Alzheimer), in un soggetto affetto ad esempio da una patologia ad esordio disesecutivo (come ad esempio la malattia di Parkinson) può non evidenziare il deterioramento cognitivo.

Milan Overall Dementia Assessment (MODA)(Brazzelli, Capitani, Della Sala, Spinnler & Zuffi, 1994). Anche questa è una batteria usata per lo screening neuropsicologico ed è, quindi, modellata sulla base dei deficit che i pazienti con demenza possono mostrare ai diversi livelli di gravità. È composta da tre sezioni comprendenti ognuna diverse prove:

Sezione orientamentiche includei seguenti test:

- ✓ Orientamento temporale
- ✓ Orientamento spaziale
- ✓ Orientamentopersonale
- ✓ Orientamento familiare

Sezione test Neuropsicologici che includono:

- apprendimento reversal
- test di attenzione
- test di intelligenza verbale
- test di memoria episodica
- test di fluenza semantica
- test dei gettoni
- test per l'agnosia digitale
- l'aprassia costruttiva .

5.7.3Strumenti di valutazione neurofisiologica

In riferimento alla valutazione neurofisiologica quest'ultima è stata eseguita mediante la registrazione elettroencefalografica utilizzando un amplificatore EEG digitale costituito da 21 canali di acquisizione .

Gli elettrodi sono stati posizionati sullo scalpo utilizzando i criteri previsti dal sistema di misurazione internazionale 10/20 il riferimento è stato posizionato su FPz e la terra posteriormente ad Fz, come riportato da precedenti studi (Formaggio et al., 2008; Storti et al. 2012).Il segnale elettroencefalografico è stato acquisito con una frequenza di campionamento di 256 Hz e sottoposto ad un filtraggio passa banda tra 3-60 Hz, per eliminare le basse e le alte frequenze, e un filtro notch a 50 Hz per eliminare i disturbi di rete.

La durata di registrazione è stata di 20 minuti ed è stata condotta in condizione di riposo psicosensoriale ad occhi chiusi ed intervallata a brevi periodi in cui venivano fatti aprire gli occhi al fine di valutare la reattività del ritmo alfa registrato dalle aree della corteccia occipitale. Da ciascun intervallo di registrazione sono state selezionate4 epoche di tracciato della durata di 3 minuti ciascuna prive di artefatti da sottoporre ad analisi EEG quantitativa.

5.7.4 Strumenti di stimolazione transcranica

La tDCS è stata somministrata con modalità anodica ad un'intensità di 2 mA, per una durata di 20 minuti per dieci giorni consecutivi tramite uno stimolatore connesso ad una coppia di elettrodi di spugna, imbevuti di soluzione salina e cosparsi di gel elettroconduttore, collegati ad uno stimolatore a corrente costante (tipo HDC stimulation isolato dalla rete elettrica poiché dotato di alimentazione propria (batterie a basso voltaggio). L'elettrodo attivo è stato posizionato sulla aree prefrontali dell'emisfero dominante l'elettrodo di riferimento sul muscolo deltoide contro-lateralmente ai siti di stimolazione. La sede di stimolazione è stata individuata mediante i riferimenti del sistema internazionale 10-20 per l'elettroencefalogramma.

5.8 Valutazione neuro-cognitiva basale.

I pazienti del primo gruppo non differivano in maniera statisticamente significativa dai soggetti di controllo per età, scolarità e punteggi ottenuti ai test psicometrici.

Le caratteristiche neuropsicologiche e socio-demografiche dei due gruppi di soggetti sono riassunte nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche socio-demografiche e neuropsicologiche.

Soggetti	Medie gruppo sperimentale (n8) (ds)	Medie gruppo controlli (n 8) <i>media (ds)</i>
età (anni)	68,5 ds 2,8	68,7 ds 3,1
scolarità (anni)	6,7 ds 2,0	6,2 ds 2,7
mmse (punteggio)	15,8 ds 1,80	15,9 ds 1,64
moda (punteggio)	74,5 ds 3,7	74 ds 2,4

Tabella 2. punteggi test cognitivi per singolo soggetto gruppo sperimentale.

Età	Scolarità	MMSE	MODA
65	9	19	80
71	5	14	73
67	7	15	70
68	8	16	74
66	3	13	73
65	5	15	75
72	5	14	71
74	12	18	80

Tabella 3 punteggi singoli mmse test basale gruppo sperimentale

Soggetti	orientamento temporale	orientamento spaziale	registrazione di parole	attenzione e calcolo	rievocazione	linguaggio	scrittura	prassia costruttiva
I°	2	3	3	5	3	1	1	1
II°	2	1	3	4	1	1	1	1
III°	2	2	3	3	2	1	1	1
IV°	3	2	3	3	2	1	1	1
V°	1	2	3	3	1	1	1	1
VI°	3	2	2	3	2	1	1	1
VII°	1	2	3	2	3	1	1	1
VIII°	2	3	2	5	2	1	1	1

Tabella 4 punteggi singoli test moda sezione orientamenti e autonomia (baseline) gruppo sperimentale.

soggetti	orientamento temporale	orientamento spaziale	orientamento personale	orientamento familiare	sezione: autonomia
I°	5	2	7	8	15
II°	5	1	8	9	10
III°	4	2	9	11	12
IV°	5	3	7	9	9
V°	3	2	8	9	10
VI°	4	2	8	8	15
VII°	4	2	7	8	9
VIII°	7	3	10	8	13

Tabella 5 punteggi singoli test moda sezione neuropsicologica gruppo sperimentale (Baseline)

Gruppo sperimentale	Apprendimento reversal	Test attenzionale	Intelligenza verbale	Raccontino	Test produzione parole	Test dei gettoni	Agnosia digitale	Aprassia costruttiva	Street's completion test
I°	5	9	5	5	4	5	4	3	2
II°	3	8	3	5	5	5	5	3	3
III°	4	7	3	5	4	4	3	1	1
IV°	5	8	4	6	5	5	4	2	2
V°	4	9	4	5	4	5	4	3	3
VI°	3	10	3	4	4	5	3	3	3
VII°	3	8	6	4	5	5	4	3	3
VIII°	4	9	4	4	4	5	3	3	3

Tabella n 6 punteggi globali test MMSE - MODA gruppo di controllo

età	scolarità	MMSE	MODA
71	5	16	76
64	4	14	74
69	7	18	75
66	9	18	77
67	1	15	71
73	3	14	70
68	5	15	73
72	8	18	75

Tabella n 7 punteggio singoli test mmse gruppo di controllo

Soggetti	Orientamento Temporale	Orientamento spaziale	Registrazione di parole	Attenzione e calcolo	Rievocazione	Linguaggio	Scrittura	Prassia costruttiva
I°	2	2	2	4	3	1	1	1
II°	2	2	3	3	1	1	1	1
III°	2	2	3	5	3	1	1	1
IV°	2	3	3	5	3	1	1	0
V°	1	3	3	3	2	1	1	1
VI°	2	2	3	3	1	1	1	1
VII°	2	2	2	2	3	1	1	1
VIII°	2	3	3	5	2	1	1	1

Tabella 8 punteggi singoli test moda sezione orientamenti e autonomia (test basale) gruppo di controllo

soggetti tdcs	orientamento temporale	orientamento spaziale	orientamento personale	orientamento familiare	sezione: autonomia
I°	4	2	8	9	15
II°	3	2	6	9	14
III°	4	3	9	12	14
IV°	5	2	9	9	13
V°	3	2	9	10	12
VI°	3	1	9	9	12
VII°	4	2	8	10	14
VIII°	3	2	8	8	15

Tabella 9 punteggi singoli test moda sezione neuropsicologica test basale gruppo di controllo

Gruppo controllo	Apprendimento reversal	Test attenzionale	Intelligenza verbale	Raccontino	Test produzione parole	Test dei gettoni	Agnosia digitale	Aprassia costruttiva	Street's completion test
I°	5	8	4	4	4	5	4	3	2
II°	5	9	5	3	2	5	5	3	3
III°	4	7	3	5	4	4	3	1	1
IV°	4	10	4	6	5	5	5	2	2
V°	3	9	5	4	5	4	3	1	1
VI°	2	8	3	4	5	5	3	3	3
VII°	4	8	6	6	4	4	1	1	1
VIII°	4	9	4	5	3	5	3	3	3

Tabella 10 punteggi globali MMSE MODA dopo 8 mesi di trattamento gruppo sperimentale

età sperimentale	gruppo	scolarità	mmse punteggio	moda punteggio
65		9	18	78
71		5	14	71
67		7	14	70
68		8	15	74
66		3	14	71
65		5	16	73
72		5	14	71
74		12	17	80

Tabella 11 punteggio MMSE singoli test dopo trattamento

Soggetti	Orientamento Temporale	Orientamento spaziale	Registrazione di parole	Attenzione e calcolo	Rievocazione	Linguaggio	Scrittura	Prassia costruttiva
I°	2	3	3	4	3	1	1	1
II°	2	1	3	4	1	1	1	1
III°	2	2	3	3	2	1	1	0
IV°	2	2	3	3	2	1	1	1
V°	1	2	3	3	1	1	1	2
VI°	3	2	2	3	2	1	1	1
VII°	1	2	3	2	3	1	1	1
VIII°	2	3	2	5	2	1	1	1

Tabella 12 punteggi singoli test moda sezione orientamenti e autonomia nel vivere quotidiano gruppo sperimentale dopo trattamento

Soggetti	orientamento temporale	orientamento spaziale	orientamento personale	orientamento familiare	sezione: autonomia
I°	5	2	8	8	15
II°	5	1	8	9	10
III°	4	2	9	11	12
IV°	5	3	7	9	9
V°	3	2	8	9	10
VI°	4	2	8	8	15
VII°	4	2	7	8	9
VIII°	7	3	10	8	13

Tabella 13 punteggi test neuropsicologici moda dopo trattamento

Gruppo sperimentale	Apprendimento reversal	Test attenzionale	Intelligenza verbale	Raccontino	Test produzione parole	Test dei gettoni	Agnosia digitale	Aprassia costruttiva	Street's completion test
I°	5	9	5	5	4	5	4	3	2
II°	3	8	3	5	5	5	5	1	3
III°	4	7	3	5	4	3	3	1	1
IV°	5	8	4	6	5	5	4	2	2
V°	4	9	4	5	4	5	4	3	3
VI°	3	10	3	4	4	5	3	2	2
VII°	3	8	6	4	5	5	4	3	3
VIII°	4	9	4	4	4	5	3	3	3

Tabella 14 punteggi globali gruppo di controllo dopo 8 mesi

Età	Scolarità	mmse	moda
71	5	10	54
64	4	12	74
69	7	16	70
66	9	14	59
67	1	15	71
73	3	9	53
68	5	9	63
72	8	8	61

Tabella n 15 punteggio singoli test mmse gruppo di controllo

Paziente	Orientamento Temporale	Orientamento spaziale	Registrazione di parole	Attenzione e calcolo	Rievocazione	Linguaggio	Scrittura	Prassia costruttiva
I°	1	1	2	2	3	1	0	0
II°	2	2	3	2	0	1	1	1
III°	2	2	3	5	3	1	0	0
IV°	2	1	1	2	0	1	0	0
V°	1	3	3	3	2	1	1	1
VI°	0	0	3	3	0	1	1	1
VII°	2	2	2	2	0	1	0	0
VIII°	1	1	3	2	0	1	0	0

Tabella 16 punteggi singoli test moda sezione orientamenti e autonomia (test basale) gruppo di controllo

soggetti tdc	orientamento temporale	orientamento spaziale	orientamento personale	orientamento familiare	sezione: autonomia
I°	2	1	6	6	10
II°	3	2	6	9	14
III°	2	3	7	12	13
IV°	3	1	8	9	10
V°	3	2	9	10	12
VI°	2	1	5	6	10
VII°	2	2	8	10	14
VIII°	2	1	8	8	12

Tabella 17 punteggi singoli test moda sezione neuropsicologica test basale gruppo di controllo

Gruppo controllo	Apprendimento reversal	Test attenzionale	Intelligenza verbale	Raccontino	Test produzione parole	Test dei gettoni	Agnosia digitale	Aprassia costruttiva	Street's completion test
I°	3	8	2	2	4	5	4	1	0
II°	5	9	5	3	2	5	5	3	3
III°	4	7	3	5	4	4	3	1	1
IV°	2	5	4	6	2	5	2	0	0
V°	3	9	5	4	5	4	3	1	1
VI°	2	8	3	1	5	5	3	1	1
VII°	4	8	6	2	2	4	1	0	0
VIII°	4	9	4	2	3	5	3	0	0

Tabella 18 confronto punteggi medi globali MMSE MODA dopo trattamento gruppo sperimentale e di controllo.

Pazienti	Medie Gruppo sperimentale Basale (n8) (DS)	Medie gruppo sperimentale dopo 8 mesi di tDCS	Medie Gruppo Controlli Basale (N 8) <i>Media (DS)</i>	Medie gruppo di controllo dopo 8 mesi in assenza di trattamento tDCS
MMSE (Punteggio)	15,8 DS 1,80	15,2 DS 1,6	15,9 DS 1,64	11,6 DS 3,06
Moda (punteggio)	74,5 DS 3,7	73,5 DS 3,7	74 DS 2,4	63,1 DS 7,9

5.8.1 Valutazione Neurofisiologica

Tabella 19. Analisi quantitative dei ritmi theta, alpha, beta relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'') gruppo (AtDCS).

Rhythmic	Pre-test	Post-test	Follow-up
Theta	7 Hz	7.3 Hz	7. Hz
Beta	14.2 Hz	15.2 Hz	14.3 Hz
Alpha	8.1 Hz	8.6 Hz	8 Hz

Tabella 20. Analisi quantitative dei ritmi theta, alpha, beta relativa alle fasi di pretest (A), training (B), post test (A') e follow-up (A'') gruppo (SHAM).

Rhythmic	Pre-test	Post-test	Follow-up
Theta	7 Hz	6,8 Hz	6,5. Hz
Beta	13.9 Hz	14 Hz	12 Hz
Alpha	8.1 Hz	7,8 Hz	7,5 Hz

Risultati

5.9 Analisi esplorativa

Sono state studiate le performance cognitive e le modificazioni della elettrogenesi cerebrale di ogni singolo paziente sottoposto a stimolazione tDCS con modalità anodica della aree della corteccia pre-frontale per una durata di 8 mesi e controllati rispetto ad un gruppo di 8 soggetti AD sottoposti alla stimolazione placebo ed al trattamento farmacologico.

Da una prima analisi dei dati si evidenzia nei soggetti sottoposti a (AtDCS) associata al trattamento farmacologico il mantenimento delle performance cognitive così come dimostrato dai punteggi globali ottenuti nei due test cognitivi somministrati punteggio MMSE basale gruppo (AtDCS) 15,8 DS 1,80 punteggio dopo 8 mesi di trattamento 15,2 DS 1,6; punteggio Moda basale 74,5 DS 3,7 dopo trattamento 73,5 DS 3,7).

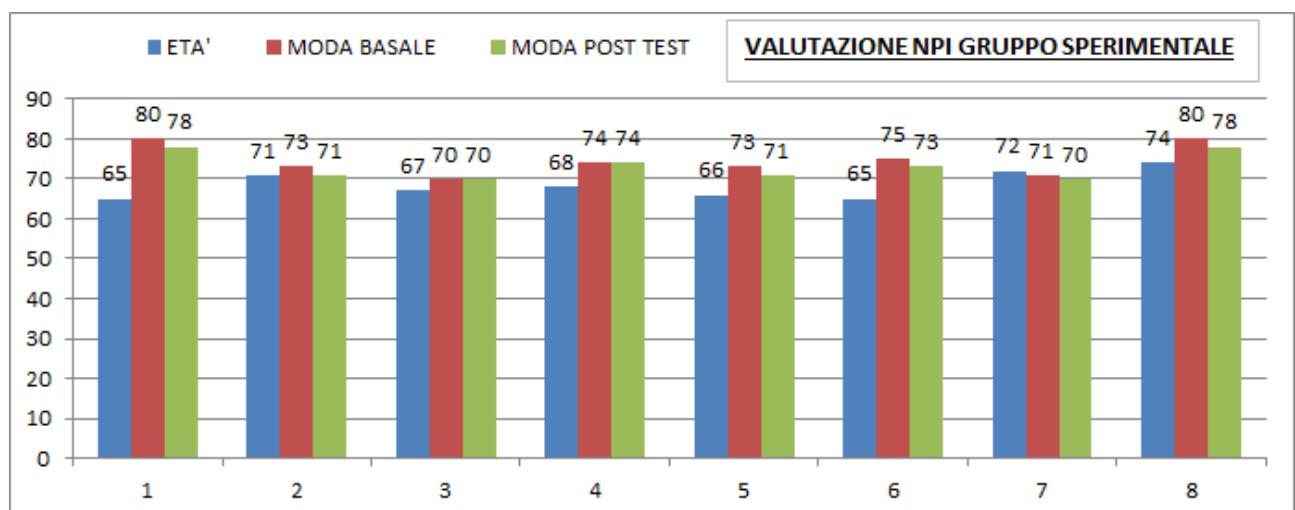
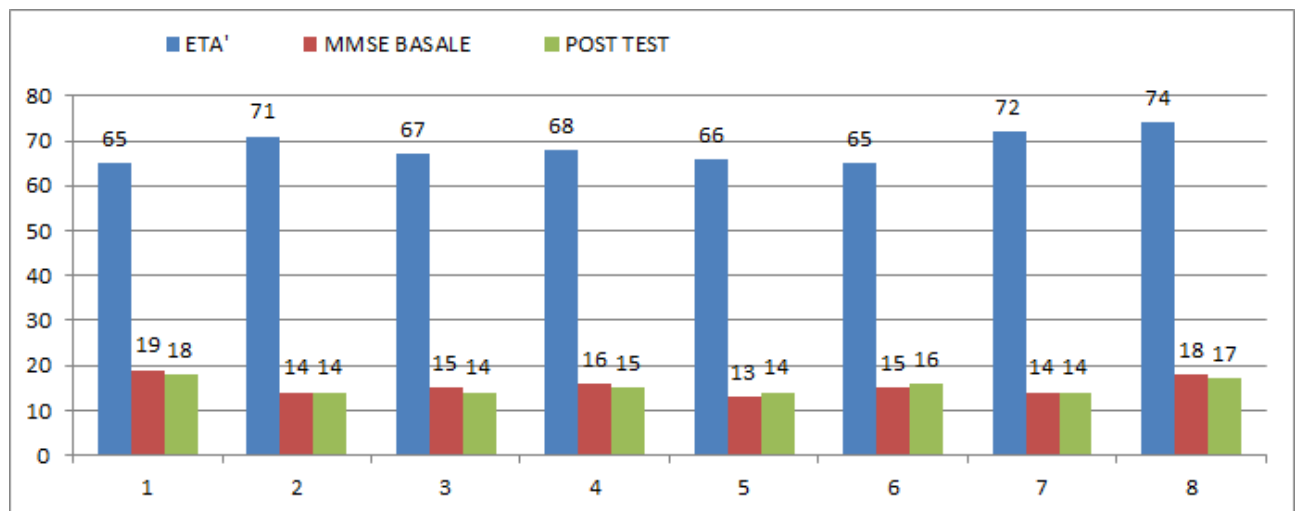
In riferimento al gruppo di controllo (SHAM) si osserva una sensibile riduzione dei punteggi ottenuti nei test psicometrici: (MMSE basale 15,9 DS 1,6; dopo 8 mesi 11,6 DS 3,06; punteggio MODA basale 74 DS 2,4; dopo 8 mesi 63,1 DS 7,9).

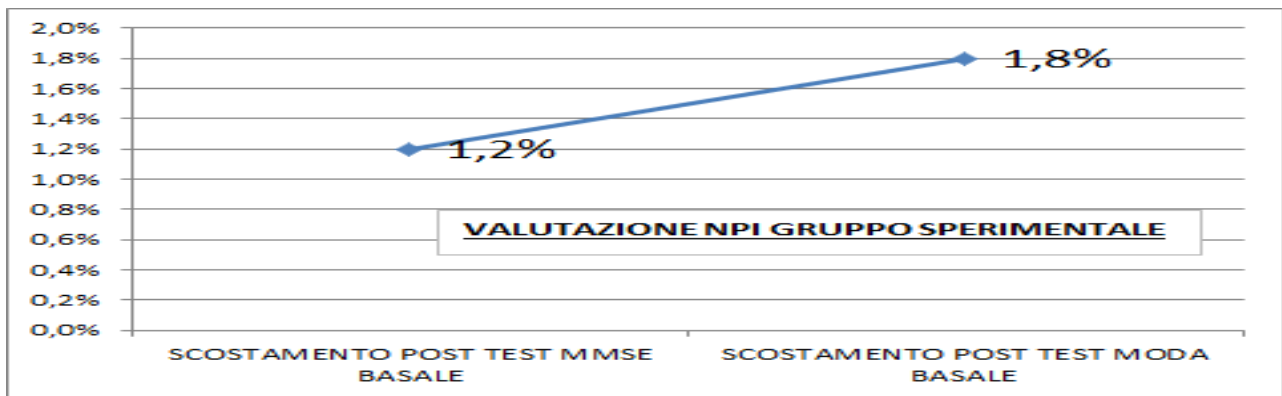
Anche la valutazione neurofisiologica così come riportato nella tabella 19 eseguita con la modalità dell'EEG quantitativo non evidenzia nel gruppo (AtDCS) significativi decrementi dello spettro di frequenza e potenza banda dei ritmi fisiologici rispetto alle condizioni iniziali.

Al contrario nel gruppo Sham tabella 20 si osserva una moderata riduzione globale della elettrogenesi cerebrale con la sostituzione dei ritmi fisiologici con attività lente principalmente della banda theta e sporadicamente delta.

Analisi medie gruppo sperimentale tab.21

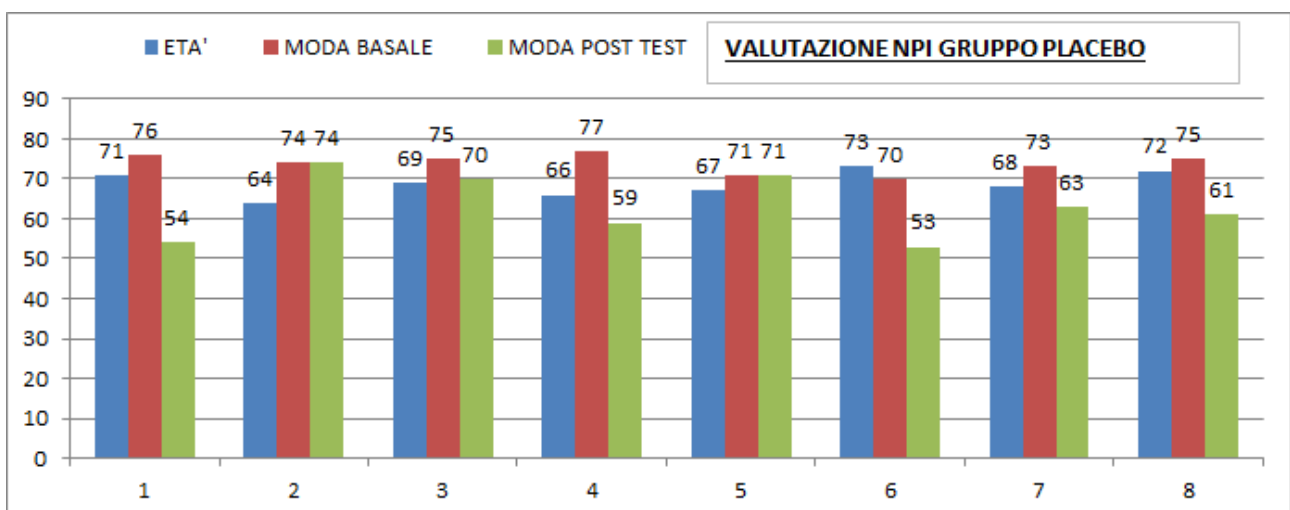
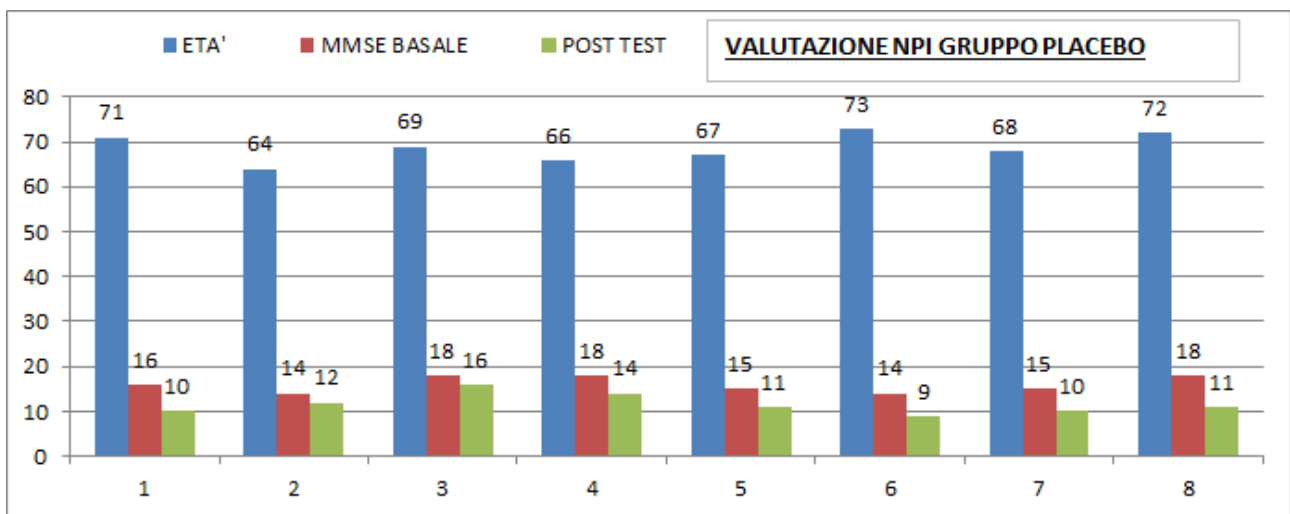
ETA'	MMSE BASALE	POST TEST	scostamento	ETA'	MODA BASALE	MODA POST TEST	0 scostamento
65	19	18	5,3%	65	80	78	2,5%
71	14	14	0,0%	71	73	71	2,7%
67	15	14	6,7%	67	70	70	0,0%
68	16	15	6,3%	68	74	74	0,0%
66	13	14	-7,7%	66	73	71	2,7%
65	15	16	-6,7%	65	75	73	2,7%
72	14	14	0,0%	72	71	70	1,4%
74	18	17	5,6%	74	80	78	2,5%
			1,2%				1,8%

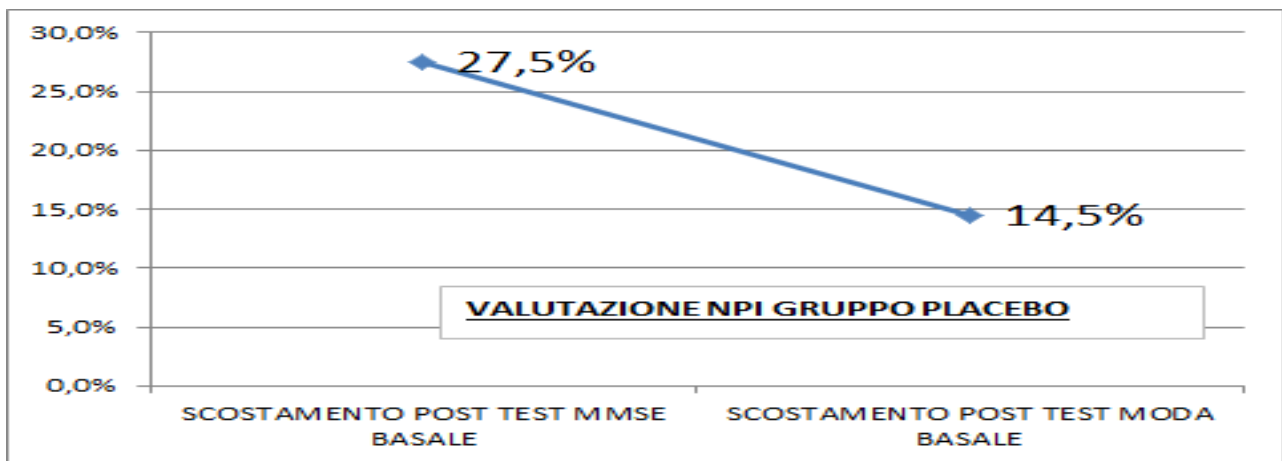




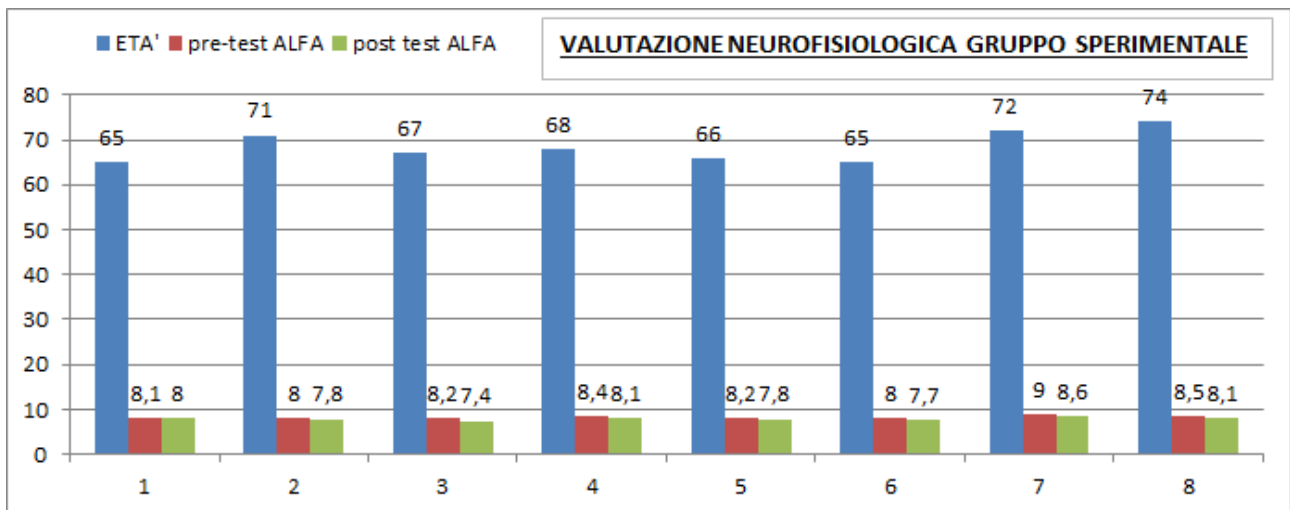
Analisi medie gruppo placebo

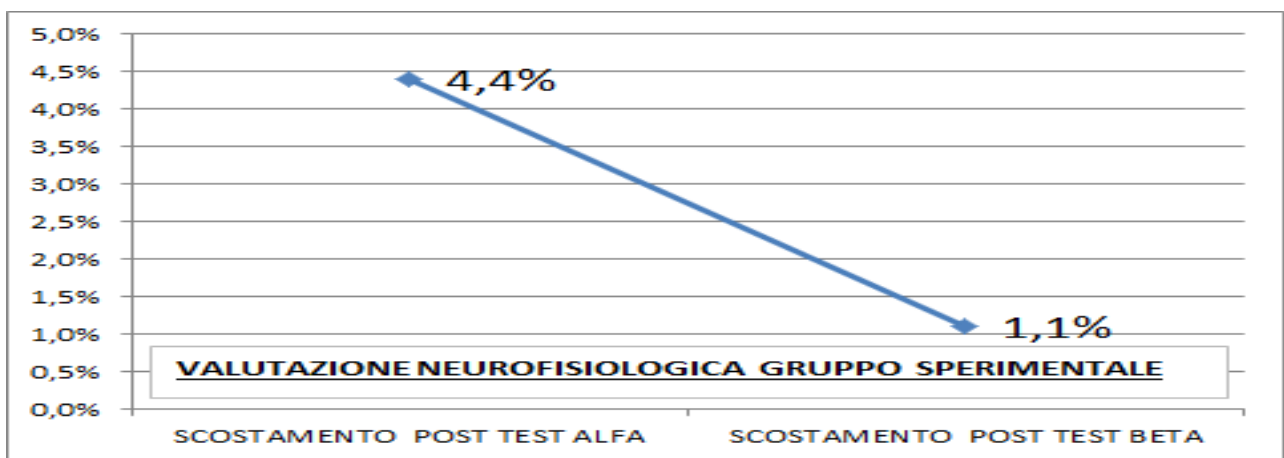
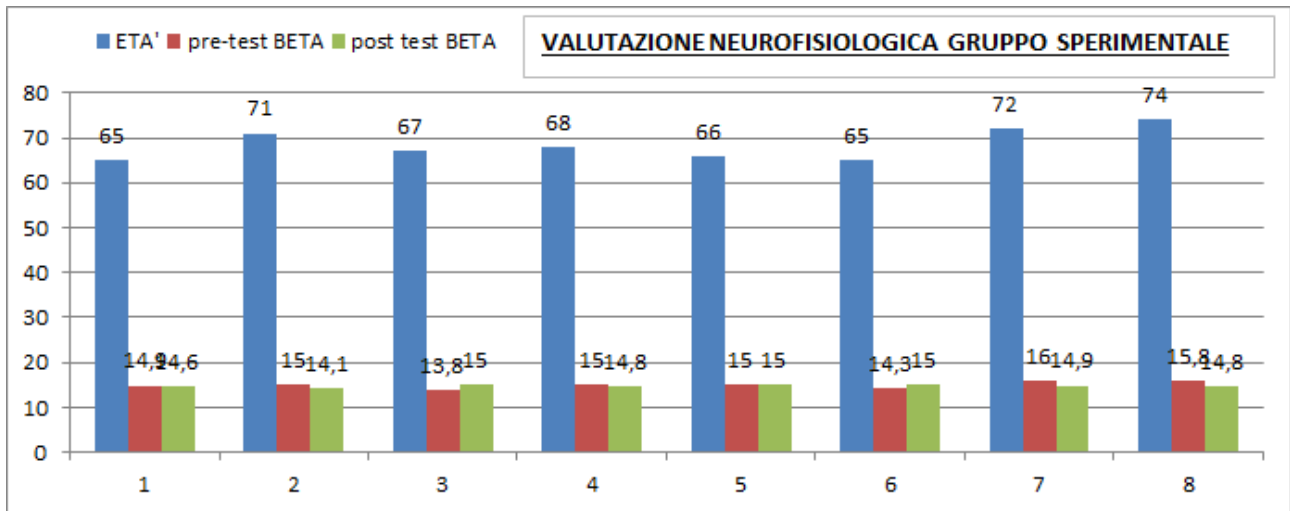
ETA'	MMSE BASALE	POST TEST	scostamento	ETA'	MODA BASALE	MODA POST TEST	scostamento
71	16	10	37,5%	71	76	54	28,9%
64	14	12	14,3%	64	74	74	0,0%
69	18	16	11,1%	69	75	70	6,7%
66	18	14	22,2%	66	77	59	23,4%
67	15	11	26,7%	67	71	71	0,0%
73	14	9	35,7%	73	70	53	24,3%
68	15	10	33,3%	68	73	63	13,7%
72	18	11	38,9%	72	75	61	18,7%
			27,5%				14,5%



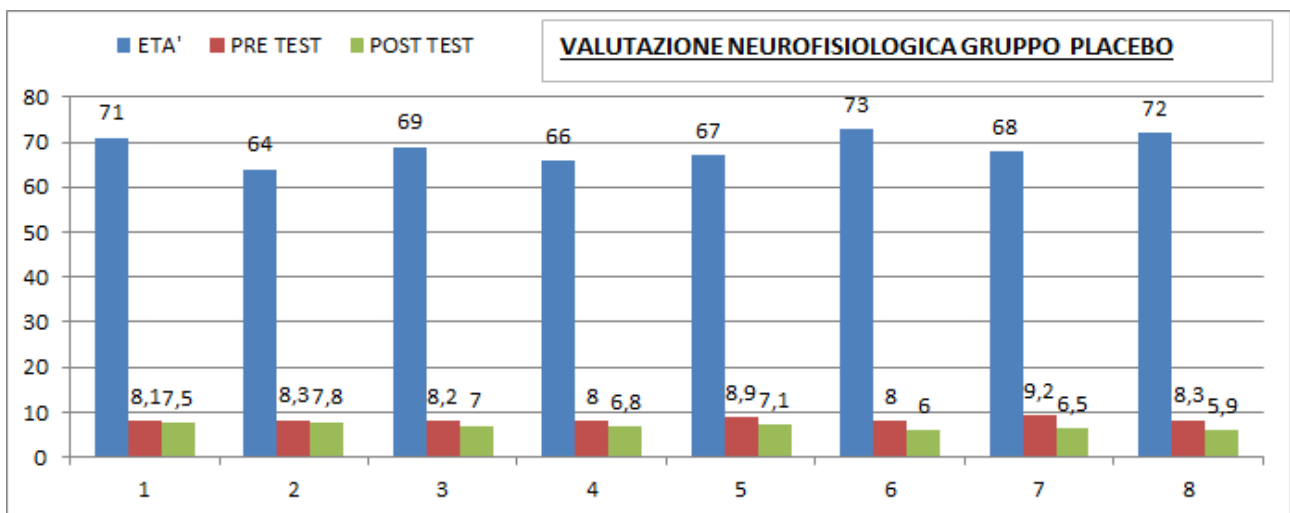


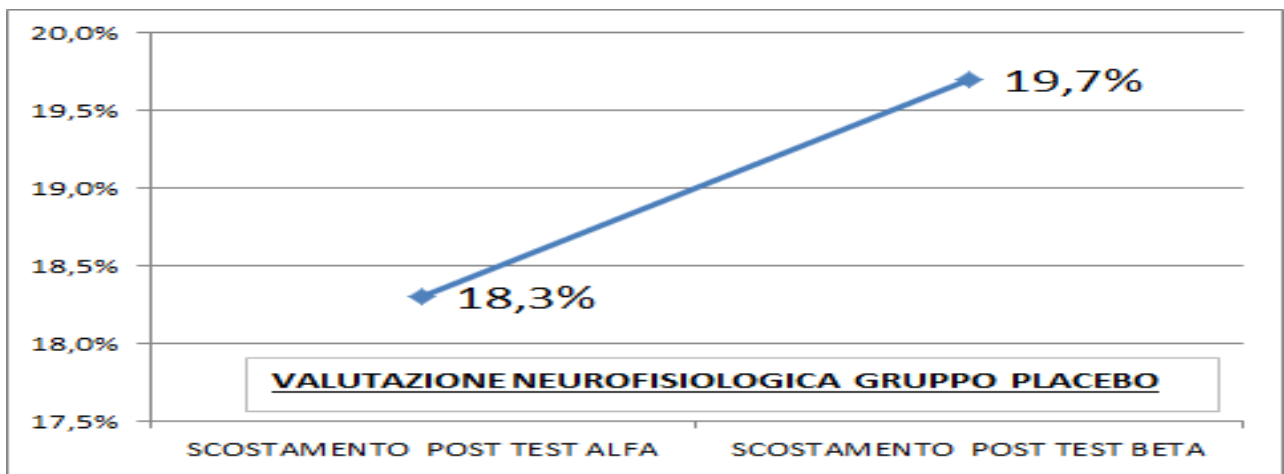
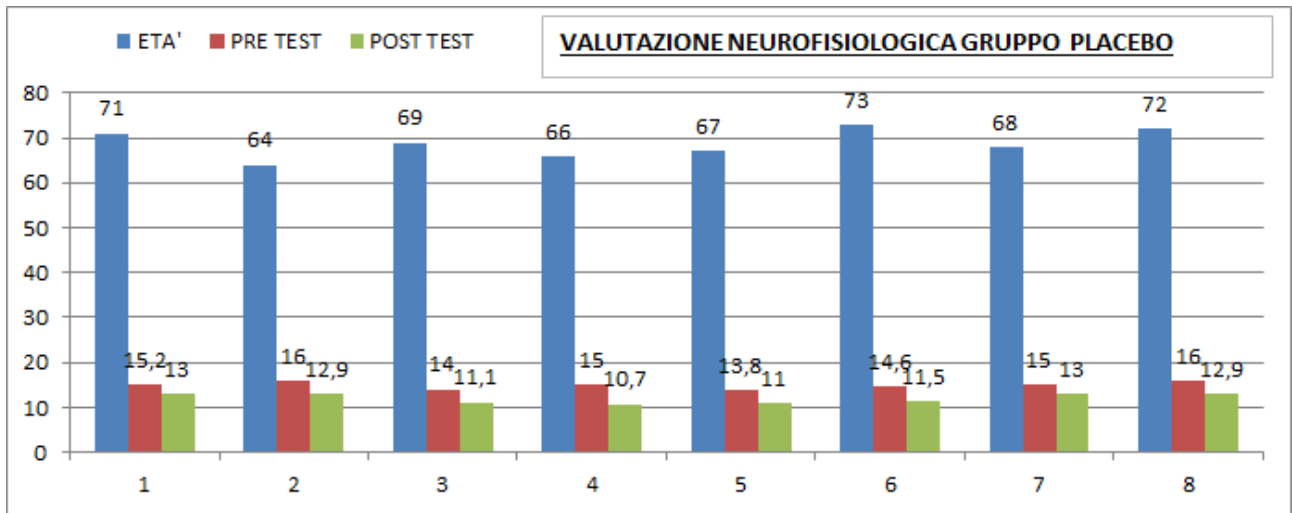
valutazione neurofisiologica				valutazione neurofisiologica			
ETA'	pre-test ALFA	post test ALFA	scostamento	ETA'	pre-test BETA	post test BETA	scostamento
65	8,1	8	1,2%	65	14,9	14,6	2,0%
71	8	7,8	2,5%	71	15	14,1	6,0%
67	8,2	7,4	9,8%	67	13,8	15	-8,7%
68	8,4	8,1	3,6%	68	15	14,8	1,3%
66	8,2	7,8	4,9%	66	15	15	0,0%
65	8	7,7	3,8%	65	14,3	15	-4,9%
72	9	8,6	4,4%	72	16	14,9	6,9%
74	8,5	8,1	4,7%	74	15,8	14,8	6,3%
			4,4%				1,1%





ETA'	PRE TEST	POST TEST	scostamento	ETA'	PRE TEST	POST TEST	scostamento
71	8,1	7,5	7,4%	71	15,2	13	14,5%
64	8,3	7,8	6,0%	64	16	12,9	19,4%
69	8,2	7	14,6%	69	14	11,1	20,7%
66	8	6,8	15,0%	66	15	10,7	28,7%
67	8,9	7,1	20,2%	67	13,8	11	20,3%
73	8	6	25,0%	73	14,6	11,5	21,2%
68	9,2	6,5	29,3%	68	15	13	13,3%
72	8,3	5,9	28,9%	72	16	12,9	19,4%
			18,3%				19,7%

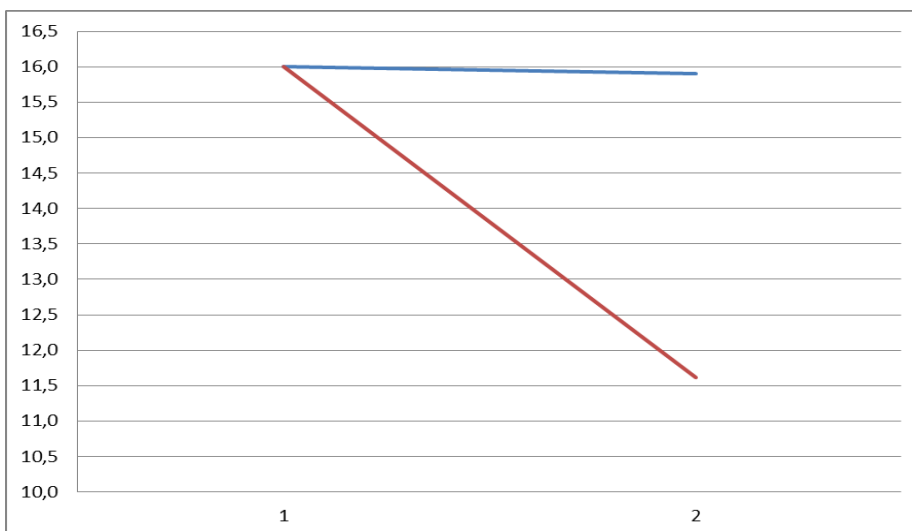




5.9.1 Analisi statistica dei risultati

I dati sono stati analizzati prima in riferimento ai test globali: Moda e MMSE e poi in riferimento alle singole sottoscale di entrambi i test. I risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza a misure ripetute con una variabile between subject (gruppi: sperimentale vs sham) e una within subject (fasi: pre-test vs post-test). La variabile “gruppo” non presenta effetti significativi, mentre la variabile relativa all’interazione gruppi x fasi presenta effetti significativi, $F(1, 15) = 12,98$, $p < 0.001$. Questo dato indica che in rapporto alle fasi i gruppi si comportano in maniera diversa, come si evince dalla figura 1. Specificatamente il gruppo sperimentale mostra un sostanziale mantenimento della prestazione, mentre il gruppo sottoposto a sham + farmaco presenta il classico decremento della prestazione dovuto alla patologia.

Figura 1. Interazione Fasi x Gruppo



MODA

In riferimento al test MODA i dati sono stati sottoposti anche in questo caso ad analisi della varianza a misure ripetute 2 gruppi (sperimentale versus sham) X 2 fasi (pre-test versus post-test). Le medie e le deviazioni standard relative ai vari parametri sono riportate nella tabella 1. Ancora una volta, sia la variabile “gruppi” sia la variabile relativa all’interazione gruppi x fasi presentano effetti significativi, rispettivamente: $F(1,20) = 8,71$, $p < 0.001$ e $F(1,20) = 11,002$, $p < 0.001$. Anche in questa seconda analisi, i dati indicano che in rapporto alle fasi i gruppi si comportano in maniera diversa, ovvero il gruppo sperimentale ha un sostanziale mantenimento della prestazione, mentre il gruppo sottoposto a sham + farmaco presenta il classico decremento della prestazione dovuto alla patologia.

Tabella1. Media e deviazione standard relative alle fase di pre-test e post-test dei test MMSE e MODA nei due gruppi sperimentali

Gruppi	MMSEpre	MMSE post	MODA pre	MODA post
Sperimentale	16,00	15,90	74	73,75
Controllo	16,00	11,62	74	63,12

MMSE

La variabile "Fasi" presenta effetti altamente significati $F(1,20) = 80,14; p < 0.01$.

Analisi statistica dei risultati ottenuti nelle sottoscale dei test MMSE e MODA

I dati sono stati analizzati in riferimento alle singole sottoscale di entrambi i due test.

Orientamento temporale MMSE e MODA

Il fattore Gruppi presenta effetti significativi nella sottoscala del MMSE che valuta l'orientamento temporale, anche l'interazione Fasi x Gruppo, $F(1, 14) = 2,96; p < 0.01$. Questo dato indica che la tDCS ha avuto un effetto positivo sulla funzione cognitiva dell'orientamento temporale nei soggetti sottoposti al trattamento tDCS+farmaco, in cui la prestazione presenta un sostanziale mantenimento, rispetto invece al gruppo sham+farmaco in cui la prestazione presenta un peggioramento.

Per quanto concerne l'orientamento temporale valutato attraverso la relativa sottoscala del test MODA, la variabile Gruppi presenta effetti significativi e anche l'interazione Fasi x Gruppi, $F(1,20) = 2,96; p < 0.01$. Dunque, anche nella sottoscala del MODA si verifica lo stesso andamento dei due gruppi, osservato anche nella sottoscala MMSE. Specificatamente, la prestazione relativa all'orientamento temporale del gruppo tDCS+farmaco presenta un sostanziale mantenimento, rispetto invece al gruppo sham+farmaco in cui la prestazione non presenta un miglioramento bensì un peggioramento. Questo dato indica che la tDCS ha avuto effetto positivo sulla funzione cognitiva dell'orientamento temporale valutata con l'ausilio di due differenti test, nei soggetti sottoposti al trattamento tDCS+farmaco.

Orientamento spaziale MMSE e MODA

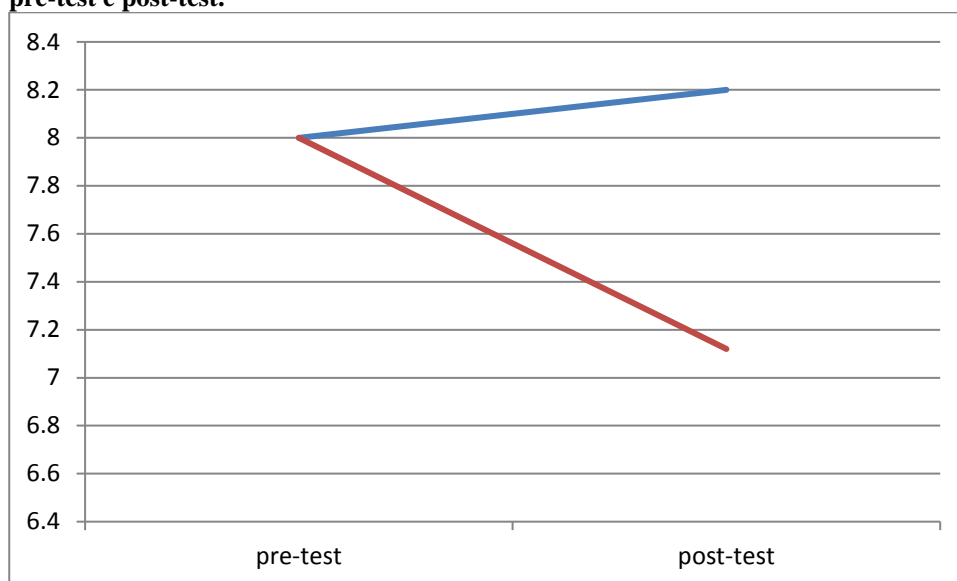
La sottoscala del MMSE che valuta l'orientamento spaziale presenta effetti significativi relativamente alla variabile gruppi e alla variabile interazione Fasi x Gruppo, $F(1, 14) = 1,05, p < 0.5$. Questo dato indica che la tDCS ha avuto un effetto positivo rispetto alla funzione orientamento spaziale nel gruppo sperimentale.

La sottoscala del test MODA che studia l'orientamento spaziale, presenta effetti significativi relativamente alla variabile Gruppi e all'interazione Fasi x Gruppi, $F(1,20) = 1,02; p < 0.001$. Questo dato indica che la tDCS ha avuto effetti positivi sulla funzione cognitiva dell'orientamento spaziale nei soggetti sottoposti al trattamento tDCS+farmaco in cui la prestazione presenta un sostanziale mantenimento, rispetto invece al gruppo sham+ farmaco in cui la prestazione presenta un netto decremento.

Orientamento personale MODA

In riferimento alla sottoscala del MODA che misura l'orientamento personale presenta effetti significativi relativamente alla variabile Gruppi e all'interazione Fasi x Gruppo, $F(1,20) = 5,55$; $p < 0,05$. Come si evince dalla figura 2, questo dato indica che la tDCS ha avuto effetto positivo sulla funzione cognitiva dell'orientamento personale nei soggetti sottoposti al trattamento tDCS+farmaco, in cui la prestazione presenta un sostanziale mantenimento, rispetto invece al gruppo sham+ farmaco in cui la prestazione relativa all'orientamento temporale non presenta un miglioramento bensì un peggioramento.

Figura 2. Andamento dei due gruppi rispetto alla sottoscala dell'Orientamento personale del MODA nelle fasi di pre-test e post-test.



Orientamento familiare MODA

I dati relativi all'orientamento familiare, misurati attraverso la sottoscala del MODA, non presentano effetti significativi nelle variabili considerate, $F(1,20) = 2,33$; $p < 0,14$.

Autonomia MODA

Come ci si aspettava data la patologia di cui è affetto il campione e il tempo di insorgenza, la sottoscala del MODA relativa all'autonomia non presenta effetti significativi nelle variabili considerate, $F(1,20) = 1,32$, $p < 0,2$. Tuttavia, rispetto ai due gruppi è il gruppo di controllo a presentare un decremento della prestazione.

Apprendimento Reversal MODA

Anche la sottoscala del MODA che valuta le capacità di apprendimento non presenta effetti significativi nelle variabili considerate, $F(1,20) = 2,33$; $p < 0,14$. Tuttavia, rispetto ai due gruppi è il gruppo di controllo a presentare un decremento della prestazione.

Intelligenza verbale MODA

Anche la sottoscala del MODA che misura l'intelligenza verbale non presenta effetti significativi nelle variabili considerate, $F(1,20) = 1,00$; $p < 0,4$. Tuttavia, rispetto ai due gruppi è il gruppo di controllo a presentare un decremento della prestazione. Anche se non si raggiunge la significatività statistica, le funzioni considerate presentano un lieve mantenimento nel gruppo tDCS+farmaco, rispetto al gruppo sham+farmaco che mostra un lieve decremento.

Raccontino MODA

La sottoscala del MODA che valuta la capacità di comprensione presenta effetti significativi relativamente alla variabile Gruppi e alla variabile interazione Fasi x Gruppo, $F(1,20) = 6,33$; $p < 0,025$.

Produzione parole MODA

La sottoscala del MODA che misura la capacità di produrre parole non presenta effetti significativi nelle variabili considerate, $F(1,20) = 2,21$; $p < 0,15$. Questo dato è coerente con quanto ipotizzato, dal momento che la tDCS è stata applicata sulle aree della corteccia fronto-temporale ci aspettavamo un miglioramento delle capacità relative alla memoria piuttosto che a quelle linguistiche.

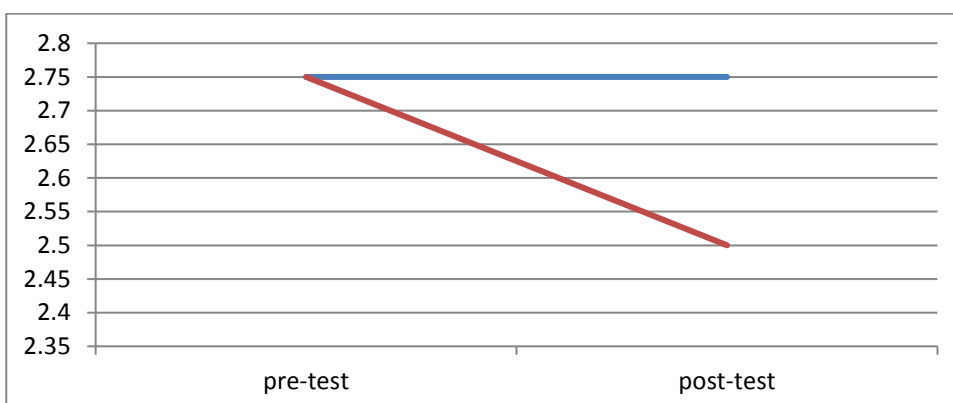
Registrazione parole MMSE

La sottoscala del MMSE che esamina la capacità di memorizzare le parole non presenta effetti significativi né in merito alle fasi, né al gruppo né all'interazione Fasi x Gruppo, $F(1,20) = 0,065$; $p < 0,8$. Questo dato indica che la tDCS non ha avuto effetto rispetto alla funzione orientamento spaziale dal momento che le aree stimolate sono correlate ad altre funzioni cognitive.

Attenzione e calcolo MMSE

Relativamente alla sottoscala che valuta le capacità di attenzione e calcolo sono significative sia la variabile fasi sia la variabile interazione gruppo x fasi $F(1,20) = 4,07$; $p < 0,05$. Come si evince dalla figura 3.

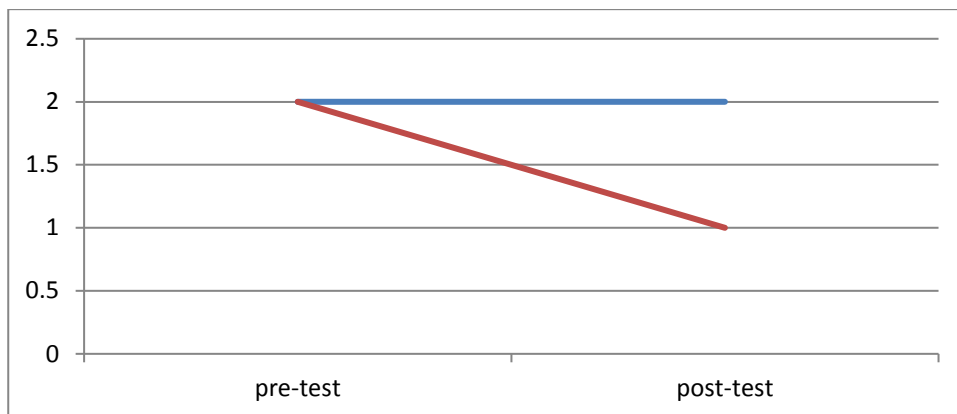
Figura 3. Andamento dei due gruppi relativo alla sottoscala Attenzione e Calcolo del MMSE nella fase di pre-test e post-test



Rievocazione

Per quanto riguarda la sottoscala rievocazione, si assiste a una sostanziale perdita di questa capacità da parte del gruppo sham + farmaco e un sostanziale mantenimento di questa abilità per il gruppo sperimentale, $F(1,20) = 4,07$; $p < 0.05$, come si osserva dalla figura 4.

Figura 4. Andamento dei due gruppi relativo alla sottoscala Rievocazione del MMSE nella fase di pre-test e post-test



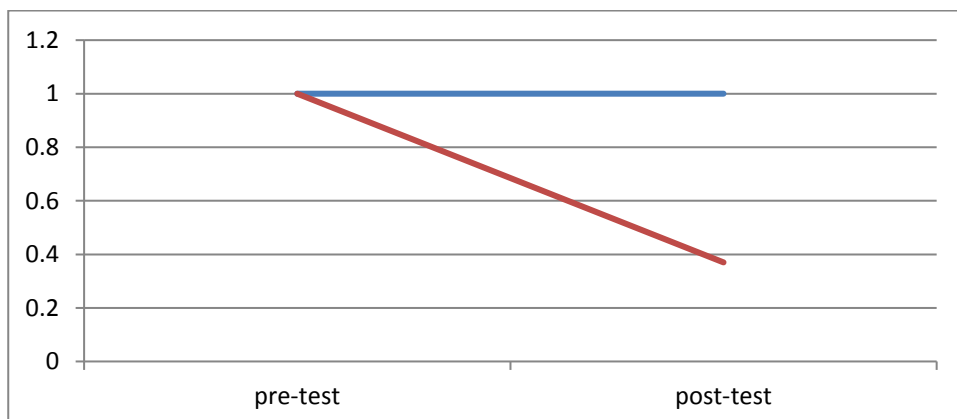
Linguaggio

Anche per quanto concerne le capacità linguistiche, valutate attraverso la rispettiva sottoscale del MMSE, non si rilevano effetti significativi né in merito alle fasi, né al gruppo né all'interazione Fasi x Gruppo, $F(1,20) = 0,065$; $p < 0.8$.

Prassia costruttiva

Anche in questo caso i dati indicano un effetto significativo della variabile relativa all'interazione fasi x gruppo, $F(1,20) = 5,72$; $p < 0.01$. Questo dato indica che nel gruppo sperimentale si assiste ancora una volta a un sostanziale mantenimento della capacità prassiche rispetto al gruppo sham+farmaco in cui invece si verifica un decremento della prestazione, come si può osservare dalla figura 5.

Figura 5. Andamento dei due gruppi relativo alla sottoscala Prassia Costruttiva del MMSE nella fase di pre-test e post-test.



5.10. Discussione

I dati ottenuti dallo studio di questa popolazione di pazienti Alzheimer sembrano coerenti ed in linea con quelli riportati in letteratura. Da questa ricerca emerge che l'effetto combinato e protratto nel tempo della stimolazione transcranica a correnti dirette e del trattamento farmacologico, ha determinato nel gruppo sperimentale la stabilizzazione di importanti funzioni cognitive come la memoria, l'orientamento spaziale e temporale, le prassie e le gnosie. Anche la valutazione neurofisiologica eseguita con la metodica dell'EEG quantitativo correla con i dati cognitivi evidenziando nel lungo termine il mantenimento dei fisiologici ritmi elettrocorticali.

Questi dati preliminari ci fanno dunque ipotizzare che l'azione esercitata dalla tDCS sul sistema glutammatergico unitamente all'effetto colinergico dei farmaci, abbia espletato un effetto protettivo e di potenziamento a lungo termine su quella popolazione neuronale rese deficitarie dal processo patologico facilitando dunque i meccanismi della plasticità sinaptica (Bliss & Collingridge, 1993).

Lo studio della popolazione AD permette dunque un primo passo nel delineare nel prossimo futuro lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Bisogna tener presente tuttavia che per questa malattia, come per le altre patologie multifattoriali, l'assetto genico e anche le condizioni generali dei pazienti e delle loro abitudini di vita influiscono notevolmente sull'andamento dei disordini cognitivi. Questo studio è destinato pertanto a completarsi *in itinere* e ad arricchirsi di nuovi dati e spunti di ricerca.

6 Conclusioni

Le più recenti tecniche di neuroimmagine funzionale hanno mostrato che il sistema nervoso ha l'attitudine a riorganizzarsi "plasticamente" in rapporto agli stimoli che riceve, in virtù delle proprietà delle cellule nervose di contrarre sinapsi fra loro. Le moderne tecniche di neuromodulazione, come la tDCS, si sono dimostrate in grado di intervenire nei processi di riorganizzazione e riarrangiamento strutturale del SNC facilitando i fisiologici meccanismi di reupero funzionale anche in patologie in fase cronica. Tuttavia, ancora rimane molto da capire, in termini concreti di riabilitazione, se sia possibile, in età non evolutiva, ottenere il recupero di abilità perse o compromesse a seguito di una malattia acquisita, genetica o neurodegenerativa attraverso interventi specifici idonei a modificare le reti neurali. Per rispondere a tale questione, gli studi sperimentali, descritti nella presente tesi di dottorato, sono stati disegnati con lo scopo di promuovere la neuroplasticità, ripristinare abilità perse o compromesse in soggetti con patologia cronica attraverso un nuovo programma di trattamento che prevedeva l'uso combinato della tDCS in associazione a un training di potenziamento cognitivo applicato al linguaggio e alle funzioni cognitive in generale. Abbiamo ipotizzato che questo trattamento combinato potesse sfruttare le capacità di riorganizzazione cerebrale e favorire il recupero delle abilità ormai deteriorate. I risultati emersi in queste ricerche sono incoraggianti. Dal un punto di vista neurofisiologico, i dati mostrano come il trattamento integrato possa favorire i processi di sinaptogenesi determinando delle significative variazioni della elettrogenesi cerebrale. Dal punto di vista cognitivo, è emerso che i soggetti, sebbene in stato cronico, abbiano recuperato le abilità linguistiche e cognitive ormai perse o deteriorate. In sostanza, i risultati delle nostre ricerche dimostrano che metodi di stimolazione cerebrale come la tDCS possano supportare le tecniche riabilitative tradizionali nel trattamento di patologie croniche eziopatogenesi genetica acquisita e degenerativa, aumentandone l'efficacia. Dunque, l'ipotesi che emerge da questi studi è che il trattamento combinato proposto possa rappresentare un intervento riabilitativo efficace e possa, al tempo stesso, essere un buon metodo di studio dei meccanismi cerebrali sottostanti la plasticità. Una delle sfide che si dovrà affrontare in futuro sarà quella di rivelare i meccanismi fisiologici individuali, al fine di trovare la soluzione più semplice per la manipolazione dell'eccitabilità corticale nel contesto riabilitativo. I meccanismi neurali responsabili dei miglioramenti prolungati indotti dalla tDCS infatti sono principalmente sconosciuti, soprattutto quelli che regolano le influenze di un'area stimolata su quelle adiacenti non stimolate.

BIBLIOGRAFIA

- Abel, S., Schultz, A., Radermacher, I., Willmes, K., & Huber, W. (2005) Decreasing and increasing cues in naming therapy for aphasia, *Aphasiology*, *19*(9), 831-848.
- Ackman, J.B., Burbridge, T.J., & Crair, M.C. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, *490*, 219–25.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piiroo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research*, *85*, 525-45.
- Alladi, P. A., Roy, T., Singh, N., & Wadhwa, S. (2005). Developmentally regulated expression of c-Fos and c-Jun in the brainstem auditory nuclei of Gallus domesticus is modified by prenatal auditory enrichment. *Journal of Neurobiology*, *62*, 92–105.
- Allred, R.P., Maldonado, M.A., Hsu, J. E, & Jones, T.A. (2005). Training the “less-affected” for limb after unilateral cortical infarcts interferes with functional recovery of the impaired limb in rats. *Restor. Neurol. Neuroscience*, *24*, 297–402.
- Akrouh, A., & Kerschensteiner, D. (2014). Intersecting circuits generate precisely patterned retinal waves. *Neuron*, *79*, 422–44.
- Anglade, C., Thiel, A., & Ansaldo, A.I. (2014). The complementary role of the cerebral hemisphere in recovery from aphasia after stroke: a critical review of literature. *Brain Injury*, *28*, 138–145.
- Antonietti, A., Castelli, I., Marchetti, A., & Fabio, R.A. (2000). *La sindrome di rett: prospettive e strumenti per l'intervento*, Carocci.
- Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P.F., et al. (2001). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, *405*, 91–5.
- Ardolino, G., Bossi, B., Barbieri, S. & Priori A. (2005). Non-synaptic mechanisms underlie the after-effects of cathodal transcutaneous direct current stimulation of the human brain. *Journal of Physiology*, *568*, 654–664.
- Bernal, B., & Ardila, A. (2009). The role of the arcuate fasciculus in conduction aphasia. *Brain*, *132*, 2309–2316.

- Biernaskie, J., Szymanska, A., Windle, V., & Corbett, D. (2005). Bihemispheric contribution functional motor recovery of the affected for limb following focal ischemic brain injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 989–999
- Boggio, P.S., Berman, F., Vergara, A.O., Muniz, A.L., Nahas, F.H., Leme, P.B., Rigonatti, S.P., et al. (2007). Go–no-go task performance improvement after anodal transcranial DC stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in major depression. *J Affect Disord*, *101*, 91–98.
- Boggio, P.S., Rigonatti, S.P., Ribeiro, R.B., Myczkowski, M.L., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A., et al. (2008). Randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *11*, 249–254
- Boggio, P.S., Sultani, N., Fecteau, S., Merabet, L., Mecca, T., Pascual-Leone, A., et al. (2008). Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: a double-blind sham controlled study. *Drug Alcohol Depend*, *92*, 55–60.
- Bliss, T. (1974). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *446*, 205, 225.
- Braitenberg, V. (2001). Thoughts on the neuronal hardware of language. *Cognitive Processing*, *2* (4), 264–278.
- Brighina, F., Bisiach, E., Piazza, A., & Fierro, B. (2004). Transcranial DC stimulation of the run affected hemisphere ameliorates contralateral visuospatial neglect in humans. *Neurosci Lett*, *446*, 141–144.
- Bruce, C., & Edmundson, A. (2009). Letting the CAT out of the bag: a review of the Comprehensive Aphasia Test. *Aphasiology*, *24*, 79–93.
- Brown, C. E., Boyd, J. D., & Murphy, T.H. (2010). Longitudinal in vivo imaging reveals balanced and branch-specific remodeling of mature cortical pyramidal dendritic arbors after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, *40*, 784–791.
- Brunoni, A.R., Briones, M., & Fregni, F. A. (2008). Systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *11*, 1169–1180.

- Butefisch, C.M., Kleiser, R., & Seitz, R.J. (2006). Post-lesional cerebral reorganisation: evidence from functional neuroimaging and transcranial magnetic stimulation. *J. Physiol. Paris*, *99*, 447–454.
- Capaday, C., Ethier, C., Van Vreeswijk, C., & Darling, W.G. (2014). On the functional organization and operational principles of the motor cortex. *Front. Neural Circuits*, *7*, 66–70.
- Catani, M., & Mesulam, M. (2008). The arcuate fasciculus and the dissociation theme in language and aphasia: history and current state. *Cortex*, *44*, 953–961.
- Chikahisa, S., Sei, H., Morishima, M., Sano, A., Kitaoka, K., Nakaya, Y. et al. (2006). Exposure to music in the perinatal period enhances learning performance and alters BDNF/TrkB signaling in mice as adults. *Behavior and Brain Research*, 412–9.
- Cooke, B. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain Journal of Neurology*.
- Correia, S.C., Santos, R.X., Cardoso, S., Carvalho, C., Santos, M.S., Oliveira, C.R., et al. (2010). Effects of Estrogen in the Brain: Is it a Neuroprotective Agent in Alzheimer's Disease? *Curr Aging Sci.*, *18*.
- El Hachoui, H., Lingsma, H.F., van de Sandt-Koenderman, M.W., Dippel, D.W., Koudstaal, P.J., & Visch-Brink, E.G. (2013). Long-term prognosis of aphasia after stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *84*, 310–315
- Emptage, N.J., Reid, C.A., & Fine, A. (2001). Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*, *29*, 197–208.
- Ferrucci, R., Bortolomasi, M., Vergari, M., Tadini, L., Salvaro, B., & Giacomuzzi, M. (2009). Transcranial direct current stimulation in severe, drug-resistant major depression. *J Affect Disord*, *118*, 215–9.
- Floyd, R., & McCullumsmith, R.E. (2016). Glutamate neurotransmission in rodent models of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*.
- Freud, S. (1945). *An Autobiographical Study*. Trans J Strachey, WW Norton, New York.
- Gonzales, M. L., & Lasalle, T. (2010). *The role of Mecp2 in brain developmental and neurodevelopmental disorder*. School of Medical Microbiology and immunology, University of California.
- Golde, T.E. (2004). Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *JCI*, *111*, 11–18.

- Johnson, R. E., & Kerschensteiner D. (2014). Retrograde plasticity and differential competition of bipolar cell dendrites and axons in the developing retina. *Current Biology*, 24, 2401–6.
- Harlow, H., Dodsworth, R., Harlow, M. (1965). Total social isolation in monkeys. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 54, 90-97.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behaviour*. Wiley, New York.
- Hofman A. et al. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the rotterdam study. *Lancet*, 449, 151-154.
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10, 647–58.
- Howard, K.L. & Filley, C.M. (2009). Advances in genetic testing for Alzheimer's disease. *Rev Neurol. Dis*, 6, 26-42.
- Hua, J.Y., Smear, M.C., Baier, H., & Smith, S.J. (2005). Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature*, 444, 1022–6.
- West Coast Conference on Formal Linguistics (1990: Stanford University) & Halpern, Aaron Lars & Center for the Study of Language and Information (U.S.) & Stanford Linguistics Association (1991). *The proceedings of the Ninth West Coast Conference on Formal Linguistics*. Published for the Stanford Linguistics Association by the Center for the Study of Language and Information, Stanford, CA
- Liepert, J., Graef, S., Uhde, I., Leidner, O., & Weiller, C. (2000). Training-induced changes of motor cortex representations in stroke patients. *Acta Neurol. Scand.*, 101, 421–426.
- Liepert, J., Miltner, W.H.R, Bauder, H., Sommer, M., Dettmers, C., Taub, E., & Weiller, C. (1998). Motor cortex plasticity during constraint-induced movement therapy in stroke patients. *Neurosci Lett*, 250, 5–8.
- López-Arrieta, J.M., Rodríguez, J.L., Sanz, F. (2000). Nicotine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2, 17-49.
- Lustbader, J.W. et al. (2004). AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 404, 448-52.

- Luzzatti, C., Willme, K., & De Bleser, R. (1996). *Aachener aphasia test: versione italiana*. Firenze: OS Organizzazioni Speciali
- Malenka, R.C., & Bear MF. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5–21.
- Makin, T. R., Scholz, J., Henderson Slater, D., Johansen-Berg, H., & Tracey, I. (2015). Reassessing cortical reorganization in the primary sensorimotor cortex following arm amputation. *Brain*, 148, 2140–2146.
- Mason-Baughman, M.B. & Wallace, S.E. (2012). Semantic feature knowledge in persons with aphasia: the role of commonality, distinctiveness and importance. *Aphasiology*, 27, 364–380.
- Masur, D.M., Sliwinski, M., Lipton, R.B., Blau, A.D., & Crysta, H.A. (1994). Neuropsychological prediction of dementia and the absence of dementia in healthy elderly persons. *Neurology*, 44, 1427-1442.
- Milne, A., Culverwell, A., Guss, R., Tuppen, J., & Whelton, R. (2008). Screening for dementia in primary care: a review of the use, efficacy and quality of measures. *Int Psychogeriatr*, 20, 11-26.
- Miniussi, C. (2008). Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation/transcranial direct current stimulation in cognitive neurorehabilitation. *Brain Stimulation*, 426-446.
- Mouton, P.R., Martin, L.J., Calhoun, M.E., Dal Forno, G., & Price, D.L. Cognitive decline strongly correlates with cortical atrophy in Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging*, 19, 471-7.
- Nitsche, M.A., Liebetanz, D., Antal, A., Lang, N., Tergau, F., & Paulus, W. (2014). Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation-technical, safety and functional aspects. *Supplements to Clinical Neurophysiology*, 56, 255-276.
- Nudo, R. J. (2014). Recovery after brain injury: mechanisms and principles. *Frontiers in Human Neurosciences*, 7, 80-87.
- Origlia, N., Arancio, O., Yan, S., & Domenici, L. (2009). Neuronal and microglial RAGE dependent signal pathways involved in A β -induced synaptic dysfunction in entorhinal cortex. *Alzheimer's and Dementia Volume 5, Issue 4, Supplement 1*, 498.
- Janssen, J.C., Beck, J.A., Campbell, T.A., Dickinson, A., Fox, N.C., Harvey, R.J., Houlden, H., Rossor, M.N., & Collinge, J. (2004). Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 41 families. *Neurology*, 60, 245-9.

Kandel, E.R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science. 4th ed.* New York: McGraw-Hill Medical.

Kang, Y.K. (2009). Improved picture naming in aphasia patients treated with cathodal tDCS to inhibit the right Broca's homologue area. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 141-152.

Kim, H., Lee, M.H., Chang, H.K., Lee, T.H., Lee, H.H., Shin, M.C. et al. (2006). Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain and Development*, 2006, 109-114.

Panicker, H., Wadhwa, S., & Roy, T. S. (2002). Effect of prenatal sound stimulation on medio-rostral neostriatum/hyperstriatum ventral region of chick forebrain: a morphometric and immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat*, 24, 127-45.

Perkins, A. W. (1998). Conversing in dementia: A conversation analytic approach. *Journal of Neurolinguistic*, 44-54.

Petersen, R.C. (1995). Normal aging, mild cognitive impairment, and early Alzheimer's disease. *Neurologist*, 1, 426-444.

Phiel, C.J. et al. (2004). GSK-4a regulates production of Alzheimer's disease amyloid β -peptides. *Nature*, 42, 445-449.

Pilaz, L.J. & Silver, D.L. (2015). Post-transcriptional regulation in corticogenesis: how RNA-binding proteins help build the brain. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5, 501-15.

Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 462, 429-444.

Ronan, J.L., Wu, W., & Crabtree, G.R. (2014). From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet*, 14, 447-59.

Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer disease. *Nature*, 499, 24-40.

- Simons, M., De Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G., & Beyreuther, K. (1996). Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, *16*, 899–908.
- Soto, C. (1999). Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today*, *5*, 444-450.
- Sabah, G. (2001). Language and human-machine communication. *Cognitive Processing*, *2*, 279–408.
- Schlaug, S. M. (2011). The Use of Non-invasive Brain Stimulation Techniques to Facilitate Recovery from Post-stroke Aphasia. *Neuropsychological Review*, 288-401.
- Sharma, V., Nag, T.C., Wadhwa, S., & Roy, T.S. (2009). Temporal distribution of mRNA expression levels of various genes in the developing human inferior colliculus. *NeurosciLett*, *461*, 229–44.
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, *444*, 707–12.
- Stemmer, B. & Whitaker, H. A. (2008). *Handbook of the Neuroscience of Language*, Elsevier, Amsterdam.
- Szaflarski, J. V. (2011). Excitatory repetitive transcranial magnetic stimulation induces improvements in chronic post-stroke aphasia. *Medical Science Monitor*, 142-149.
- Tesak, J., & Code, C. (2008). *Milestones in the history of aphasia theories and protagonists*. Hove, NY: Psychology Press.
- Turkeltaub, P.E., Coslett, H.B., Thomas, A.L., Faseyitan, O., Benson, J., Norise, C., et al. (2012). The right hemisphere is not unitary in its role in aphasia recovery. *Cortex*, *48*, 1179–1186.
- Turkeltaub, P.E., Messing, S., Norise, C., & Hamilton, R. H. (2011). Are networks for residual language function and recovery consistent across aphasic patients?. *Neurology*, *76*(20), 1726-1734.
- Turrigiano, S. N. (2004). Homeostatic Plasticity in the developing nervous system. *Nature*, 97-107.
- Uesaka, N., Ruthazer, E.S., & Yamamoto, N. (2006). The role of neural activity in cortical axon branching. *Neuroscientist*, *12*, 102–106.

Ungerleider, L.G., Doyon, J., & Karni, A. (2002). Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiological Learning Memory*, 78, 554–564.

Vandenborre, D., Visch-Brink, E., & Mariëna, P. (2015). The development of modern approaches to aphasia: a concise overview. *International Journal of Rehabilitation Research*, 28, 1-6.

Villamar, A.P. (2012). Noninvasive Brain Stimulation to Modulate Neuroplasticity in Traumatic Brain Injury. *Neuromodulation*, 426-448.

Watt, A.J., Cuntz, H., Mori, M., Nusser, Z., Sjöström, P.J., & Häusser, M. (2014). Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci*, 12, 464–74.

Wernicke, C. (1874). *The aphasic symptoms complex: a psychological study of anatomical basis*. Breslau, Poland: Cohn & Weigert.

Yu, G. et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and beta APP processing. *Nature*, 407, 48-54.

Zeller, D., Litvak, V., Friston, K. J., & Classen, J. (2015). Sensory processing and the rubber hand illusion – an evoked potentials study. *J. Cogn. Neurosci*, 27, 574–582.