



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

**INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA E
FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO**

XXIV CICLO

Direttore della Scuola: Prof. Eusebio Tolu

**PROPRIETÀ FISILOGICHE DELLA CORTECCIA MOTORIA FACCIALE
NELL'UOMO:
STUDIO DEI CIRCUITI INTRACORTICALI FACILITATORI ED INIBITORI
E MODULAZIONE DELLA PLASTICITÀ SINAPTICA**

Tutor:

Prof.ssa Franca Deriu

Tesi di dottorato di:

Dr.ssa Giovanna Pilurzi

Anno Accademico

2010 - 2011

INDICE

	Pagina
SOMMARIO	4
INTRODUZIONE	9
1. La stimolazione magnetica transcranica	10
1.1. Principi fisici	10
1.2. Fisiologia di base	14
1.3. Doppio stimolo	22
- <i>SICI-ICF</i>	22
- <i>SICF-LICI</i>	22
1.4. Inibizione afferente a breve e lunga latenza	28
1.5. Potenziamento a lungo termine e plasticità	31
1.6. Neurofarmacologia della TMS e tDCS	40
2. Il sistema motorio facciale	47
2.1. Muscoli facciali	49
2.2. I nuclei motori facciali	50
2.3. Corteccia Motoria Facciale	52
STUDIO 1	
I circuiti intracorticali inibitori e facilitatori a breve e lunga latenza nella corteccia facciale	
1. Obiettivi	59
	38
2. Materiali e metodi	
2.1. Soggetti	61
2.2. Registrazione EMG	62
2.3. Stimolazione magnetica transcranica	63
2.4. Procedure sperimentali	64
2.5. Analisi dei dati	66
3. Risultati	67
3.1. Studio della SICI e ICF nella corteccia motoria facciale	68
4. Discussione	80

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

	75
	Pagina
STUDIO 2	
Integrazione sensori-motoria e plasticità nella corteccia motoria facciale	86
1. Obiettivi	86
2. Materiali e metodi	88
2.1. Soggetti	88
2.2. Registrazione dell'attività EMG	88
2.3. Stimolazione magnetica transcranica	89
2.4. Stimolazione elettrica periferica	90
2.5. Procedure sperimentali	90
2.6. Analisi dei dati	94
3. Risultati	95
4. Discussione	102
CONCLUSIONI	105
BIBLIOGRAFIA	107

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

SOMMARIO

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Il distretto motorio facciale, per la sua complessità morfo-funzionale, è tecnicamente difficile da studiare e mal si presta come modello per gli studi di stimolazione transcranica (TMS), che com'è noto, consentono di esplorare la fisiologia e la fisiopatologia corticale dell'uomo, in maniera non invasiva e ripetibile. Benché con la TMS a singolo stimolo siano state definite le caratteristiche dei potenziali motori registrati da numerosi muscoli facciali, non ci sono al momento dati conclusivi né sull'organizzazione funzionale della via cortico-facciale, né sulla funzionalità dei circuiti intracorticali inibitori e facilitatori, nelle due condizioni di riposo e attivazione muscolare.

Sempre a causa delle peculiarità del distretto facciale, i fenomeni d'integrazione sensori-motoria a livello corticale e di plasticità corticale nell'uomo, sono stati studiati in maniera estensiva nella corteccia motoria degli arti superiori e inferiori, mentre nessun dato è al momento disponibile per il distretto della faccia.

In questa tesi sono state affrontate le problematiche suddette. Il lavoro è stato articolato in due fasi, realizzate attraverso lo svolgimento di due diversi studi.

STUDIO 1. Il primo studio si proponeva di dare un contributo alla materia, ancora controversa, dell'asimmetria delle proiezioni cortico-facciali e di studiare l'eccitabilità intracorticale della corteccia motoria facciale, sia in condizione di riposo che di contrazione muscolare. Lo studio è stato condotto su 19 soggetti sani, di età media di 34.1 ± 8.3 anni. I potenziali motori (MEP) evocati nel muscolo depressore dell'angolo della bocca (DAO) dalla TMS della corrispondente area corticale motoria primaria, sono stati registrati ipsi- e controlateralmente, per stimolazione sia dell'emisfero sinistro (19 soggetti) che dell'emisfero destro (5 soggetti). Tali

MEP sono stati caratterizzati per latenza e ampiezza, sia in condizioni di riposo che di contrazione muscolare e sia per stimolazione dell'emisfero sinistro che destro. I risultati hanno dimostrato che le proiezioni cortico-facciali che controllano il DAO sono bilaterali e asimmetriche, con preponderanza di quelle controlaterali. Il confronto dei dati ottenuti per stimolazione dei due emisferi, non ha evidenziato differenze significative, tuttavia questi ultimi dati non possono essere considerati conclusivi, a causa dell'esiguità del campione testato. Infine, è stata studiata l'eccitabilità dei circuiti intracorticali inibitori e facilitatori, mediante l'applicazione dei classici protocolli TMS utilizzati per lo studio dell'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e della facilitazione intracorticale (ICF). I risultati di questo esperimento hanno evidenziato che l'ampiezza del MEP condizionato a riposo era significativamente ridotta rispetto a quella del MEP test, agli intervalli interstimolo di 2 e 3 ms. Al contrario, agli intervalli interstimolo di 10 e 15 ms, il MEP condizionato si presentava significativamente aumentato di ampiezza. Gli esperimenti in cui sono stati confrontati i fenomeni SICI e ICF ottenuti per stimolazione dei due emisferi, non hanno dimostrato chiaramente se questi circuiti intracorticali operano allo stesso modo nei due emisferi. Tuttavia, anche in questo caso, non possono essere tratte conclusioni dato il piccolo campione studiato.

STUDIO 2. Il secondo studio si proponeva di indagare l'integrazione sensori-motoria a livello della corteccia facciale e di valutare la plasticità della corteccia facciale che innerva la muscolatura della parte inferiore del volto. Lo studio è stato condotto in 15 soggetti. Per studiare l'integrazione sensori-motoria è stato utilizzato il paradigma dell'inibizione afferente a breve latenza (SAI). A tale scopo sono stati misurati gli effetti indotti sul MEP del DAO dalla TMS della corteccia facciale controlaterale, quando

questa era preceduta dalla stimolazione elettrica della branca mandibolare del nervo facciale (15 soggetti) o del ramo mentale del nervo trigemino (4 soggetti). I risultati hanno dimostrato che nessun tipo di stimolazione afferente (facciale e trigeminale) a nessuno degli intervalli inter-stimolo testati (5-30 ms) modifica in maniera significativa il comando motorio corticale, sia in condizione di riposo che di attivazione muscolare. Per valutare la plasticità corticale è stato utilizzato il protocollo della stimolazione accoppiata di uno stimolo elettrico periferico e di uno stimolo magnetico centrale (PAS). Nel nostro caso l'intervallo inter-stimolo efficace era pari a 20 ms, la durata dell'intervento PAS era di 13 minuti e la valutazione dei MEP dopo l'intervento è stata effettuata sino a 30 minuti dalla sua interruzione. I risultati di questo studio hanno dimostrato dopo intervento PAS, l'ampiezza del MEP è significativamente aumentata, sino a 30 minuti dall'intervento, con caratteristiche simili a quelle della plasticità di tipo LTP.

I risultati del nostro lavoro contribuiscono a chiarire alcuni aspetti importanti della fisiologia del sistema motorio facciale.

Nello STUDIO 1 abbiamo dimostrato che anche l'area motoria che proietta ai motoneuroni facciali che controllano la muscolatura inferiore del volto è regolata dai circuiti inibitori a breve latenza (SICI) e facilitatori (ICF), sia a riposo che durante attivazione muscolare. Questo risultato ha chiarito i dati contrastanti in letteratura, dimostrando che i circuiti inibitori GABAergici e quelli facilitatori glutamatergici operano nella corteccia motoria facciale dell'uomo sano anche in condizione di attivazione muscolare. Inoltre i dati ottenuti suggeriscono ulteriormente la bilateralità

ed asimmetria delle proiezioni cortico-facciali dirette alla muscolatura inferiore del volto.

Nello STUDIO 2 è stato dimostrato per la prima volta che è possibile evocare LTP nella corteccia motoria della muscolatura facciale a riposo nonostante l'output motorio facciale sembri non essere influenzato dalla stimolazione periferica. È stato dimostrato che la LTP può essere indotta solo nel MEP a riposo, stimolando il nervo facciale e non il nervo trigemino, utilizzando come intervallo inter-stimolo 20 ms. Questo dato suggerisce che i meccanismi fisiologici alla base dell'apprendimento nel sistema motorio facciale sono analoghi a quelli del sistema motorio degli arti superiori ed inferiori.

INTRODUZIONE

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

1. LA STIMOLAZIONE MAGNETICA TRANSCRANICA .

1.1. Principi fisici.

L'uso della stimolazione magnetica transcranica (TMS) negli ultimi 20 anni ha permesso di chiarire molti aspetti della fisiologia del sistema di moto nell'uomo. Molte delle conoscenze attuali derivano sia da esperimenti condotti direttamente su soggetti sani che su pazienti, sia dal confronto dei dati ottenuti da questi con quelli ottenuti nell'animale da esperimento, in particolare nella scimmia, in cui è stato possibile verificare direttamente e in maniera invasiva le ipotesi formulate a seguito degli esperimenti di TMS condotti sull'uomo. Fin dagli anni 50, sono stati numerosi i tentativi di stimolare il cervello umano attraverso lo scalpo intatto, usando treni di stimoli elettrici analoghi a quelli che fino ad allora venivano applicati direttamente sulla corteccia cerebrale di soggetti sottoposti a interventi neurochirurgici (Gualtierotti and Patterson 1954). Nonostante alcuni successi, tali tecniche non furono comunemente usate perché molto dolorose. Merton e Morton (1980) furono i primi a dimostrare che l'applicazione di singoli stimoli elettrici di alto voltaggio e breve durata, in corrispondenza della corteccia motoria primaria, induceva un'attivazione dei muscoli controlaterali al lato stimolato e che l'applicazione di tali stimoli in corrispondenza della corteccia visiva induceva la comparsa di fosfeni. Il più grosso problema di questo tipo di stimolazione, chiamata anche stimolazione elettrica transcranica (TES), consisteva nel fatto che soltanto una piccola frazione della corrente applicata penetrava attraverso il cranio e raggiungeva le strutture eccitabili cerebrali, mentre la maggior parte si distribuiva tra gli elettrodi stimolanti producendo la contrazione dei muscoli dello scalpo e l'attivazione delle fibre nocicettive con conseguente fastidio e dolore. Nel 1985 l'introduzione della stimolazione magnetica transcranica da parte di Anthony Barker dell'Università di Sheffield UK (Baker et al.

1985) ha permesso di superare questi limiti. Essa, infatti, si dimostrò sin da subito una tecnica di stimolazione corticale non invasiva, sicura e soprattutto non dolorosa, aprendo la strada allo studio della corteccia motoria e della via di moto nell'uomo. Il principio fisico alla base della TMS è rappresentato dall'induzione elettromagnetica regolata dalla legge di Faraday. Secondo questa legge, un campo magnetico è capace di indurre un campo elettrico, e quindi di conseguenza una corrente elettrica in un tessuto eccitabile. Lo stimolatore magnetico consiste di due parti distinte: un generatore e accumulatore di corrente, capace di generare correnti con amperaggio pari o maggiore a 5000 Ampere e una bobina di spire di rame (coil) in cui il passaggio della corrente induce un campo magnetico ad alta intensità (~ 3 Tesla) e di breve durata ($< 200 \mu s$), con linee di flusso perpendicolari al piano del coil (figura 1). Il campo magnetico generato nel coil viaggia liberamente nell'aria e può facilmente attraversare i tessuti. La corrente indotta sullo scalpo dalla TMS è inferiore rispetto a quella prodotta dalla stimolazione elettrica e infatti la sensazione avvertita è molto lieve e non fastidiosa. Il campo magnetico attraversa la cute e il cranio e raggiunge facilmente il tessuto cerebrale sottostante con un'attenuazione trascurabile, inducendo un campo elettrico che ha la capacità di depolarizzare la membrana degli elementi cerebrali eccitabili. Il campo elettrico indotto dalla stimolazione magnetica si distribuisce in maniera differente rispetto a quello indotto dalla TES. In quest'ultimo caso, infatti, la corrente fluisce dall'anodo in tutte le direzioni, sia radialmente che tangenzialmente alla superficie corticale. Invece il campo elettrico indotto dalla stimolazione magnetica è più omogeneo, risulta perpendicolare al campo magnetico e quindi parallelo, ma con direzione di corrente opposta, al campo elettrico, che fluendo nel coil ha dato origine al campo magnetico

stesso.

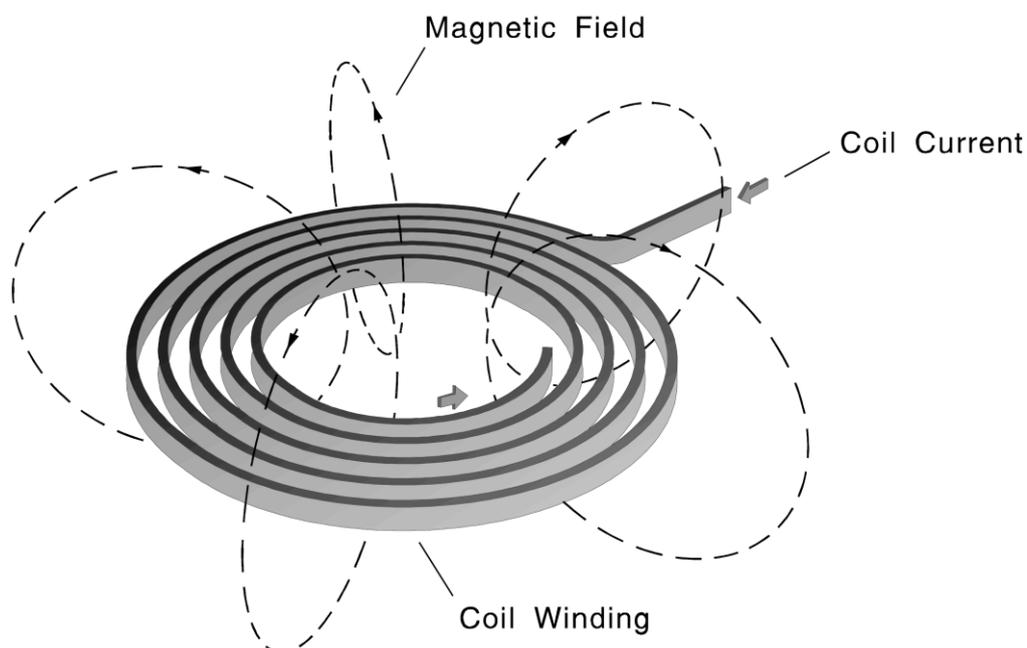


Figura 1

Struttura semplificata del coil circolare utilizzato nella stimolazione magnetica transcranica. La corrente elettrica attraversando le spire del coil, induce un campo magnetico perpendicolare al piano del coil.

Il campo magnetico decade rapidamente in funzione della distanza dal coil. Ad esempio con un tipico coil circolare di dodici cm, la forza del campo magnetico si riduce a metà ad una distanza di 4-5 cm (Hess et al. 1987). Dal momento che la corteccia cerebrale dista 1-2 centimetri dalla superficie del cranio, e lo stesso solco centrale è profondo almeno due cm, la TMS non permette di stimolare le strutture cerebrali profonde, quali gangli della base e talamo. Inoltre la resistenza della sostanza bianca è molto maggiore rispetto a quella della sostanza grigia, di conseguenza le correnti indotte nei tessuti sottocorticali sono estremamente piccole rispetto a quelle indotte negli strati superficiali della corteccia cerebrale.

Esperimenti condotti sulle scimmie, utilizzando alte intensità di stimolo, hanno permesso di dedurre un'altra caratteristica importante della TMS: l'attivazione delle fibre corticospinali non si diffonde oltre la sostanza grigia e pertanto questa metodica di stimolo è particolarmente utile nello studio dell'eccitabilità corticale intrinseca (Edgley et al. 1990). La distribuzione spaziale del campo elettrico indotto dalla TMS dipende dalla forma, posizione e orientamento del coil e dalla conduttività elettrica delle strutture cerebrali. I coil possono avere differenti forme e dimensioni e solitamente sono costituiti da una struttura plastica che riveste e isola le spirali di rame. I primi coil prodotti avevano una forma circolare con un diametro compreso tra gli otto e i dodici cm e si sono dimostrati molto utili nei primi studi di stimolazione corticale dell'area motoria della mano e delle radici spinali, perché permettevano di stimolare aree corticali molto estese senza la necessità di cercare un punto di stimolazione specifico (hot spot). Questo era possibile perché la corrente indotta nell'encefalo era massima proprio sotto l'anello, mentre risultava pressoché uguale a zero al centro del coil (figura 2A). Quest'assenza di focalità ha tuttavia rappresentato il maggior limite del coil circolare, rendendolo inadatto in tutte quelle situazioni in cui l'area stimolata doveva essere la più piccola e precisa possibile, come ad esempio negli studi di topografia corticale. Per ovviare a questo problema sono stati costruiti coil che presentano due anelli attaccati, i cosiddetti coil a figura di 8, o coil a farfalla, il cui principale vantaggio è rappresentato dal fatto che la corrente indotta nel tessuto cerebrale è massima al centro del coil, ossia nel punto in cui i due anelli s'incontrano, consentendo quindi stimolazioni con alta focalità (figura 2B). Nel corso degli anni vari altri tipi di coil (es: coil a doppio cono), sono stati prodotti al fine di permettere la stimolazione ottimale di strutture specifiche quali il cervelletto o l'area motoria degli arti inferiori.

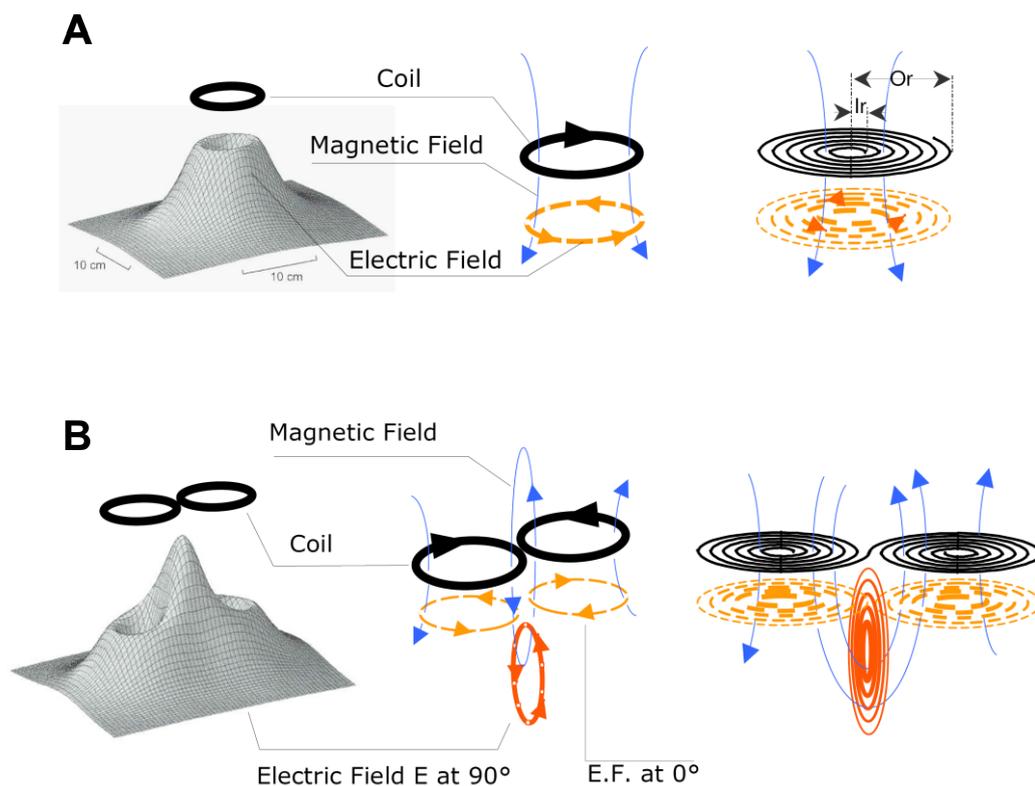


Figura 2

Nella figura è illustrata la differenza tra il campo magnetico indotto da un coil circolare (A) ed il campo magnetico indotto dal coil focale (B). Utilizzando il coil circolare, il campo magnetico presenta la sua massima intensità sotto l'anello e di conseguenza il campo elettrico indotto a livello delle strutture corticali eccitabili ha una scarsa focalità. Il coil focale invece, genera un campo magnetico massimo in prossimità del centro del coil, nel punto in cui si uniscono i due anelli inducendo un campo elettrico estremamente localizzato.

1.2. Fisiologia di base della TMS.

A tutt'oggi, nonostante la miriade di studi, siamo ancora lontani dalla completa comprensione di tutti i meccanismi attraverso i quali la TMS agisce. Due di questi sono stati comunque ben caratterizzati. Da un lato, infatti, osserviamo un'azione diretta della corrente elettrica indotta dal campo magnetico, generato dal coil, sugli elementi neurali quali assoni, dendriti e corpi cellulari; dall'altro invece si osservano gli effetti indiretti secondari all'attivazione trans-sinaptica degli elementi neurali eccitati. Ad

esempio l'attivazione diretta delle grosse cellule piramidali dello strato V della corteccia motoria indotta dalla TMS, determina numerosi effetti diffusi a carico di tutti i bersagli post-sinaptici, che sono difficilmente quantificabili, se consideriamo l'estrema complessità delle strutture corticali oggetto di studio. Un singolo neurone piramidale, infatti, può ricevere circa 60.000 contatti sinaptici, e a sua volta può contattare altri 5000 neuroni (Abeles, 1991). Questa complessità contrasta spesso con i modelli estremamente semplificati che nel corso degli anni sono stati proposti per spiegare i risultati ottenuti dai vari esperimenti di TMS, che pertanto devono essere interpretati ed utilizzati con estrema cautela e spirito critico. Abbiamo già descritto in precedenza come il campo magnetico generato dalla TMS decada rapidamente in funzione della distanza dal coil, come il pattern di corrente indotta nell'encefalo dipenda dal tipo e dalla forma del coil e come il campo elettrico indotto si diffonda solo sul piano orizzontale e non radiale, rimanendo parallelo alla superficie del coil. Accanto a queste tre importanti caratteristiche, intrinseche alla metodica di stimolo, dobbiamo considerare l'importanza della geometria dei solchi presenti nella corteccia cerebrale. Diverse evidenze hanno infatti dimostrato che la TMS è particolarmente efficace nell'eccitare i neuroni corticospinali presenti nel bordo anteriore del solco centrale (Davey et al. 1994), dove è localizzata la maggior parte dell'area 4, piuttosto che sulla convessità del giro precentrale (Geyer et al. 1996).

Nel loro studio più famoso condotto su cani e scimmie, Patton e Amassian (1954), hanno descritto come singoli stimoli elettrici di alta intensità, applicati sulla corteccia motoria di tali animali, inducevano scariche multiple discendenti nel tratto corticospinale ad una frequenza di circa 600 Hz. Essi fornirono chiare evidenze che la scarica iniziale era prodotta dall'eccitazione diretta degli assoni corticospinali, mentre quelle più tardive originavano da

un'attivazione trans-sinaptica delle cellule corticospinali. Essi quindi coniarono i termini di onde D (dirette) e onde I (indirette) per descrivere queste risposte. Le onde D persistevano dopo anestesia o ablazione della corteccia motoria, mentre le onde I richiedevano che la sostanza grigia fosse intatta ed eccitabile. Mentre la natura corticale delle onde I era chiara fin dai primi studi (Amassian et al. 1987; Patton and Amassian 1954, 1960), per lungo tempo si è dibattuto sul substrato anatomico alla loro base. Inizialmente, considerando il ritardo tra la latenza dell'onda D e la latenza della prima onda I (solitamente attorno ad 1.2 ms) era stata ipotizzata una connessione disinaptica con il neurone piramidale (Rosenthal et al. 1967). Tuttavia le registrazioni intracellulari dimostrarono che questo ritardo presentava una distribuzione continua tra i 0.75 e 1.34 ms e non una distribuzione bimodale, come ci si sarebbe aspettati da una connessione disinaptica. Pertanto considerando che il tempo di trasmissione sinaptica tra due neuroni è di circa 0.5 ms, fu ipotizzata una connessione di tipo monosinaptico, che induceva una depolarizzazione della membrana postsinaptica con un ritardo maggiore rispetto ad altri siti, verosimilmente perchè per indurre il potenziale d'azione che si propagava nella cellula piramidale, era necessaria la sommazione di diversi potenziali postsinaptici eccitatori (EPSPs). Vari esperimenti sono stati condotti sia sull'animale che sull'uomo, nel tentativo di individuare gli elementi responsabili della genesi di questi input eccitatori ai neuroni piramidali. Inizialmente si pensò alle proiezioni talamo corticali a partenza dai nuclei laterale e ventrale anteriore del talamo, perché studi precedenti avevano dimostrato la proprietà di questi nuclei di eccitare monosinapticamente le cellule piramidali nella corteccia motoria nel gatto (Amassian and Weiner, 1966). Tuttavia lesionando queste strutture, era possibile registrare ancora le onde I (Amassian et al. 1987) e pertanto l'attenzione dei ricercatori si concentrò su

altre aree corticali che proiettavano alla corteccia motoria quali le aree premotorie, l'area supplementare motoria e la corteccia somatosensitiva (DeFelipe et al. 1986; Jones 1983; Matsumara and Kubota, 1979; Muakassa and Strick, 1979). La dimostrazione che la stimolazione di queste aree, mediante elettrodi di superficie, era capace di indurre delle onde I ripetitive nel tratto piramidale, associata all'osservazione che la stimolazione diretta degli strati corticali profondi della corteccia motoria, dove si osserva una più alta concentrazione di fibre corticocorticali induceva più facilmente onde I, supportava l'ipotesi che le proiezioni corticocorticali fossero implicate nella genesi delle onde I (Amassian et al. 1987; DeFelipe et al. 1986). Tuttavia nessun esperimento di lesione delle aree premotorie o somatosensoriali è stato effettuato per confermare in maniera definitiva in quale area corticale erano fisicamente localizzati gli elementi cellulari che davano origine a queste proiezioni corticocorticali. Per spiegare come un singolo stimolo era capace di indurre una serie di scariche discendenti a intervalli periodici (I1, I2, I3) è stato proposto che le onde I tardive (I2, I3) fossero generate da un'iniziale attivazione di interneuroni superficiali che eccitavano neuroni più profondi, che a loro volta proiettavano ai neuroni piramidali, determinando un effetto di amplificazione a cascata (Amassian et al. 1987). E, infatti, congelando gli strati corticali superficiali, si osservava la scomparsa delle onde I tardive, mentre le precoci erano solitamente conservate. Questa ipotesi tuttavia era in apparente contrasto con il fatto che quando veniva applicata una stimolazione elettrica superficiale, le onde I tardive presentavano una soglia più alta rispetto alle onde I precoci. Tutti questi esperimenti, condotti sull'animale, hanno comunque dimostrato, senza ombra di dubbio, che le onde I sono generate trans-sinapticamente attraverso fibre corticocorticali e che diversi elementi interneuronali

intrinseci alla corteccia motoria giocano un ruolo importante nel prolungare la risposta corticale ad un singolo stimolo.

Grazie all'introduzione della TES, e soprattutto della TMS, è stato possibile caratterizzare le onde D e le onde I anche nell'uomo, effettuando registrazioni epidurali a livello cervicale in soggetti sottoposti a interventi chirurgici sul midollo spinale (Berardelli et al. 1990; Boyd et al. 1986; Burke et al. 1990, 1992, 1993; Fujiki et al. 1996; Hicks et al. 1992; Inghilleri et al. 1989; Kaneko et al. 1996*a*; Rothwell et al. 1994) ed in soggetti coscienti non anestetizzati che avevano elettrodi a permanenza nello spazio epidurale cervicale per il trattamento del dolore cronico (Di Lazzaro et al. 1998*a*, 1988*b*; Kaneko et al. 1996*b*; Nakamura et al. 1996, 1997). Naturalmente questo tipo di studio era eseguibile solo in pochi soggetti selezionati perché invasivo. Molte informazioni sul comportamento delle onde D e I sono state quindi ottenute in maniera meno invasiva, mediante lo studio del comportamento delle singole unità motorie (SMU) in risposta a stimoli elettrici o magnetici somministrati a livello corticale (Day et al. 1987, 1989; Mills, 1991; Boniface et al. 1991; Awiszus and Feistner, 1994*a*, 1994*b*). Questa tecnica, che fornisce informazioni indirette sugli input sinaptici che arrivano ai singoli motoneuroni spinali, ha permesso di dimostrare che il motoneurone che costituisce la SMU riceve una sequenza di EPSPs generati da input monosinaptici multipli provenienti dalle onde D e dalle onde I.

Nell'uomo la stimolazione magnetica transcranica riesce ad attivare la corteccia motoria della mano sino ad una profondità di circa 1.5- 2 cm raggiungendo quindi gli strati corticali profondi o al massimo la giunzione tra sostanza grigia e bianca (Epstein et al. 1990; Rudiak and Marg 1994). Le onde I vengono più facilmente attivate, quando la corrente indotta nel

cervello ha una direzione posteroanteriore, grossomodo perpendicolare alla direzione del solco centrale, mentre le onde D vengono preferenzialmente evocate se la corrente indotta ha una direzione lateromediale, parallela al solco centrale (Kaneko et al. 1996a; Mills et al. 1992; Sakai et al. 1997; Werhahn et al. 1994). Le fibre attivate con la più bassa intensità di stimolo, che presentano cioè la soglia più bassa, sono quelle che decorrono parallele al campo elettrico indotto dalla TMS (Amassian et al. 1992). Questo sembra in accordo con i dati sperimentali ottenuti nell'animale, che dimostrano che le onde I venivano ottenute principalmente attraverso l'attivazione delle fibre corticocorticali orizzontali, orientate in senso anteroposteriore. Sebbene la natura corticale delle onde I sia stata chiaramente dimostrata, ancora oggi, a circa 50 anni dalla loro prima descrizione, il meccanismo con cui vengono generate non è conosciuto. Sono stati proposti diversi modelli nel tentativo di spiegare il fenomeno, nessuno dei quali tuttavia riesce a prevalere in quanto ognuno presenta diverse lacune. Il primo di questi meccanismi, basandosi sulle iniziali osservazioni di Patton e Amassian (Patton and Amassian, 1960; Amassian et al. 1987), prevede che le cellule corticospinali siano costantemente bombardate da input eccitatori provenienti da catene di interneuroni con caratteristiche temporali fisse. Il secondo modello prevede che ciascun tipo di onda I sia la conseguenza dell'attivazione di catene di interneuroni tra loro indipendenti, ciascuna quindi responsabile solo della genesi di un solo tipo di onda I (Day et al. 1989; Sakai et al. 1997). Una variante a questo secondo modello prevede la presenza di un circuito inibitorio gabaergico di controllo (Ziemann and Rothwell, 2000). Infine il quarto modello sostiene che il meccanismo alla base delle onde I sia secondario a proprietà intrinseche della membrana del neurone piramidale (Creutzfeldt et al., 1964; Phillips, 1987). Il primo modello fornisce un'ottima spiegazione della natura ritmica e regolare delle

onde I ed è supportato dal fatto che le altissime frequenze (sino a 600 Hz) a cui possono scaricare gli assoni corticospinali sono compatibili con un costante bombardamento da input eccitatori (Kernell and Chien-Ping, 1967; Patton and Amassian, 1954). Tuttavia tale modello ha come maggior limite il fatto che prevede un ordine fisso di reclutamento delle onde I (dalla I1 alla I3), cosa che nella realtà non avviene, come dimostrano gli studi che hanno messo in evidenza come le differenti onde I siano sensibili a differenti direzioni di corrente. Ad esempio nel muscolo I interosseo dorsale (FDI) attivo, le onde I1 sono prodotte preferenzialmente da correnti posteroanteriori mentre le I3 da correnti anteroposteriori (Day et al. 1989; Sakai et al. 1997). È pertanto più verosimile che le differenti onde I siano generate da differenti catene di interneuroni corticali come ipotizzato dal secondo modello. La presenza di catene indipendenti di interneuroni, ciascuna responsabile della genesi di un solo tipo di onda I, permette di spiegare perché le I3, a differenza delle onde più precoci, siano facilmente sopresse negli studi di TMS a doppio stimolo che valutano l'inibizione intracorticale (Di Lazzaro et al. 1998c; Hanajima et al. 1998a; Nakamura et al. 1997). I modelli sopradescritti non spiegano però due caratteristiche delle onde I: la perfetta sincronizzazione delle scariche, solitamente dopo almeno 5 ms dall'applicazione dello stimolo, ed il fatto che nella valutazione della facilitazione intracorticale a breve latenza o SICF, non si osserva una sommazione degli effetti facilitatori ad intervalli intermedi rispetto a quelli soliti in cui viene osservata. Una possibile spiegazione è che gli EPSPs responsabili di questa facilitazione sono immediatamente interrotti da successivi potenziali postsinaptici inibitori (IPSPs), in maniera analoga a quanto succede nel midollo spinale, dove i circuiti inibitori Ia disinaptici hanno la capacità di interrompere gli EPSPs originati dalle proiezioni corticali ai motoneuroni spinali. Un simile circuito

è stato dimostrato anche a livello corticale (McCormick, 1989; McCormick et al. 1993) e pertanto i suoi interneuroni avrebbero una funzione strategica di segnapasso capace di interrompere gli input eccitatori alle cellule corticospinali. Studi neurofarmacologici supportano questa ipotesi, dimostrando come anestetici volatili che potenziano la funzione dei circuiti GABA, inducono una marcata depressione delle onde I (Burke et al. 1993; Hicks et al. 1992; Kitagawa et al., 1995). Il più grosso problema con questo modello che prevede una inibizione GABAergica è rappresentato dal fatto che la sequenza di EPSPs ed IPSPs che si alternano, non trova riscontro nelle registrazioni intracellulari da cellule piramidali a seguito di stimolazioni della superficie corticale (Ghosh and Porter, 1988). Per ultimo, il quarto modello proposto prevede che la periodicità delle onde I dipenda dalle proprietà intrinseche della membrana dei neuroni piramidali che purtroppo ancora oggi sono quasi completamente sconosciute. Se la membrana avesse le caratteristiche appropriate, teoricamente un singolo stimolo potrebbe indurre una depolarizzazione di lunga durata tale da indurre scariche ripetitive ad alta frequenza come quelle descritte per le onde I. Tutti questi modelli tuttavia non chiariscono il ruolo funzionale del sistema delle onde I. Durante i movimenti volontari, infatti, la frequenza di scarica delle cellule piramidali della corteccia motoria delle scimmie raramente supera i 100 Hz (Cheney and Fetz, 1980; Evarts, 1968; Evarts et al. 1983), frequenza nettamente inferiore ai 600 Hz delle onde I. E' comunque altamente improbabile che questo sistema sia solo un artefatto conseguente all'uso di uno stimolo non fisiologico senza una rilevanza biologica. È più verosimile che il sistema sia implicato nel rilevamento dei vari input che arrivano alle cellule piramidali tramite proiezioni corticocorticali e talamo-corticali necessario per un fine e preciso aggiustamento dell'attività volontaria a segnali provenienti dal mondo esterno.

1.3. La TMS a doppio stimolo.

Nel corso degli anni grazie ai numerosi progressi tecnici è stato possibile costruire stimolatori magnetici sempre più complessi che hanno permesso di mettere a punto tecniche di stimolo differenti per lo studio delle proprietà corticali. Una tecnica molto importante è rappresentata dal “doppio stimolo” che consiste nella somministrazione, attraverso lo stesso coil, di due stimoli magnetici accoppiati, separati da un intervallo interstimolo (ISI) variabile da pochi a diverse centinaia di ms. Dapprima è stato possibile erogare due stimoli di uguale intensità. Grazie a questa tecnica è stata messa in evidenza l’inibizione intracorticale a lunga latenza o LICI (Valls-Solè et al. 1992; Wassermann et al. 1996). Solo successivamente è stato tecnicamente possibile erogare due stimoli accoppiati di diversa intensità. Con quest’ultimo protocollo sono state descritte nel 1993 (Kujirai et al. 1993) l’inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF) e successivamente (Tokimura et al. 1996; Ziemann et al. 1998a), la facilitazione intracorticale a breve latenza (SICF). Vediamo ora le principali caratteristiche di ognuno di questi sistemi.

SICI-ICF

Questo protocollo a doppio stimolo, descritto per la prima volta nel 1993 (Kujirai et al. 1993) prevede l’applicazione, attraverso lo stesso coil, di due stimoli magnetici di diversa intensità, separati da intervalli interstimolo (ISI) compresi tra 1 e 20 ms. Il primo stimolo, detto anche stimolo condizionante (CS), deve avere un’intensità inferiore alla soglia necessaria ad evocare una risposta motoria nel muscolo bersaglio. La soglia motoria può essere determinata sia nel muscolo a riposo (RMT: resting motor threshold) oppure durante lieve contrazione muscolare (AMT: active motor

threshold). Secondo quanto riportato dalla Federazione Internazionale di Neurofisiologia Clinica (IFCN guidelines) per RMT si intende quella intensità di stimolazione capace di evocare, nel muscolo a riposo, un potenziale evocato motorio (MEP) di ampiezza pari almeno a 50 μ V in almeno il 5 su 10 delle prove effettuate (Rossini et al. 1994; Rothwell et al. 1999) mentre l'AMT corrisponde a quella intensità di stimolo che permette di ottenere un MEP di circa 100-200 μ V, o comunque chiaramente distinguibile dall'attività EMG di base, in almeno il 50% delle prove (Rothwell et al. 1999). Il secondo stimolo, detto anche stimolo test (TS), ha invece un'intensità soprasoglia, ossia è capace di evocare un potenziale evocato motorio.

Gli stimoli magnetici sono solitamente somministrati tramite coil focale a farfalla, posizionato sullo scalpo in corrispondenza della corteccia motoria controlaterale con una posizione ottimale per ottenere un MEP nel muscolo bersaglio, sebbene sia possibile utilizzare anche un coil circolare centrato sul vertice (Kujirai et al. 1993). Il coil focale solitamente viene orientato in modo da indurre nell'encefalo una corrente che fluisce in senso posteroanteriore, approssimativamente perpendicolare al solco centrale. Questo orientamento si è dimostrato essere ottimale per attivare il sistema corticospinale per via trans-sinaptica (Brasil-Neto et al. 1992; Werhahan et al. 1994; Kaneko et al. 1996a; Nakamura et al. 1996). L'intensità dello stimolo condizionante usata di solito è l'80% della RMT (Kujirai et al. 1993), oppure il 90% della AMT (Ziemann et al. 1996c; Di Lazzaro et al. 1998c), mentre per lo stimolo test solitamente l'intensità viene regolata per ottenere un MEP di circa 1 mV di ampiezza nel muscolo bersaglio, che in quasi tutti gli studi è rappresentato da un muscolo intrinseco della mano, solitamente il muscolo FDI o l'abducente del quinto dito (ADM). Utilizzando ISI compresi tra 1 e 5 ms lo stimolo condizionante induce

una marcata inibizione del MEP, che si presenta solitamente ridotto del 50-90% rispetto al MEP test.

Per intervalli compresi tra 6 e 20 ms invece si osserva una facilitazione del MEP condizionato, la cui entità varia da soggetto a soggetto, ma solitamente è nel range del 120%-200% della risposta test (Kujirai et al. 1993; Ziemann et al. 1996c; Nakamura et al. 1997). Pertanto variando l'intervallo interstimolo, lo stesso protocollo di TMS ci permette di esplorare due fenomeni, uno inibitorio, la SICI ed uno facilitatorio, la ICF. Questi fenomeni vengono solitamente valutati con il muscolo a riposo in quanto la contrazione muscolare porta ad una significativa riduzione di entrambi (Ridding et al. 1995).

Sono diverse ormai le prove che supportano la natura corticale di questi fenomeni:

1. l'intensità dello stimolo condizionante non induce modificazioni dell'eccitabilità spinale, valutata testando il riflesso H, sia per intervalli interstimolo inibitori (Kujirai et al. 1993) che facilitatori (Ziemann et al. 1996c);
2. le registrazioni epidurali effettuate nell'uomo hanno dimostrato che lo stimolo condizionante è in grado di inibire le onde I generate dallo stimolo test (Di Lazzaro et al. 1998c; Nakamura et al. 1997), ma da solo non è in grado di indurre scariche delle fibre corticospinali (Di Lazzaro et al. 1998c);
3. la SICI non si osserva quando il MEP test viene indotto tramite TES nel muscolo attivo, mentre un'inibizione significativa è ottenuta se un MEP test, di ampiezza paragonabile, viene evocato tramite stimolazione magnetica (Kujirai et al. 1993). Questo è spiegabile col fatto che la TES attiva direttamente il neurone corticospinale mentre la TMS lo attiva indirettamente per via transinaptica.

Esistono inoltre almeno quattro dimostrazioni del fatto che la SICI e la ICF sono due fenomeni distinti:

1. l'intensità soglia dello stimolo condizionante necessaria ad attivare i due sistemi è differente, essa risulta inferiore per la SICI (Kujirai et al. 1993; Ziemann et al. 1996c);
2. la SICI non è strettamente dipendente dall'orientamento del coil. Al contrario la ICF si presenta più marcata quando la corrente indotta nell'encefalo è diretta in senso posteroanteriore, perpendicolarmente al solco centrale; è invece assente quando tale corrente fluisce parallela al solco centrale (Ziemann et al. 1996c);
3. in esperimenti in cui è stata utilizzata la tecnica del triplo stimolo (due stimoli condizionanti sottosoglia che precedono lo stimolo test soprasoglia) è stato osservato che l'interazione tra gli effetti di uno stimolo condizionante facilitatorio ed uno inibitorio sul MEP test ha un andamento lineare, possibile espressione della convergenza di due sistemi indipendenti verso lo stesso output, rappresentato dalla cellula piramidale;
4. La SICI e la ICF sono modulate indipendentemente da diversi farmaci attivi sul sistema nervoso centrale, e possono essere alterate singolarmente in varie patologie neurologiche e neuropsichiatriche (Ziemann, 2004).

SICF

Un'altro circuito esplorabile attraverso la TMS a doppio stimolo è quello responsabile della facilitazione a breve latenza (SICF), evidenziata per intervalli interstimolo compresi tra 0.5 e 5 ms. La metodica di stimolazione, apparecchiature tecniche, tipo e orientamento del coil sono gli stessi precedentemente descritti per la SICI e la ICF. A fare la differenza sono le intensità dello stimolo condizionante e dello stimolo test. I protocolli

utilizzati sono principalmente due: nel primo (descritto da Tokimura et al. 1996) entrambi gli stimoli hanno un'intensità lievemente superiore alla soglia motoria e si valutano gli intervalli interstimolo di 0.5 in 0.5 ms; nel secondo protocollo uno stimolo condizionante soprasoglia precede uno stimolo test sottosoglia usando una differenza tra ISI di 0.1 ms (Ziemann et al. 1998a). Anche in questo caso la quasi totalità degli studi è stata effettuata nei muscoli intrinseci della mano, mantenendo il muscolo bersaglio a riposo, in quanto l'attivazione muscolare determina una modificazione del pattern di facilitazione, inducendo la comparsa di un solo picco facilitatorio invece dei tre picchi normalmente osservati con il muscolo rilassato (Tokimura et al. 1996; Ziemann et al. 1998a; Chen and Garg, 2000; Ilic et al. 2002). Questi picchi di facilitazione si osservano a intervalli interstimolo approssimativamente compresi tra 1.1 e 1.5 ms, 2.3 e 2.9 ms, 4.1 e 4.4 ms. La differenza temporale tra i picchi è grossomodo di 1.5 ms, ossia perfettamente sovrapponibile alla differenza di latenza delle successive onde I osservate nelle registrazioni epidurali a livello cervicale. E La SICF permette, infatti, di testare il circuito responsabile della generazione delle onde I. Per molto tempo si è dibattuto se questa facilitazione fosse di origine corticale o spinale. Una prova a conferma della sua natura corticale deriva dagli studi eseguiti accoppiando la stimolazione elettrica alla stimolazione magnetica. In particolare se , uno stimolo condizionante magnetico precede uno stimolo test elettrico (stimolazione anodica), la facilitazione precedentemente descritta scompare (Tokimura et al. 1996; Ziemann et al. 1998a). Allo stesso modo, se entrambi gli stimoli somministrati sono elettrici, la facilitazione non viene osservata (Tokimura et al. 1996), verosimilmente perché la stimolazione anodica ad una intensità prossima alla soglia motoria, attiva il neurone corticospinale direttamente, senza attivare gli interneuroni e le loro proiezioni sul neurone piramidale

responsabili delle onde I (Day et al. 1989; Di Lazzaro et al. 1998a; Nakamura et al. 1996).

LICI

L'inibizione intracorticale a lunga latenza (LICI) si differenzia dai protocolli sopra descritti per gli intervalli interstimolo, che sono più lunghi (da 50 a 200 ms), e perché lo stimolo condizionante e lo stimolo test hanno la stessa intensità. Per i muscoli della mano solitamente l'intensità di stimolo viene adattata per ottenere una risposta muscolare con ampiezza di circa 1mV (Valls-Solè et al. 1992; Wassermann et al. 1996). Il protocollo LICI induce una facilitazione per intervalli interstimolo compresi tra 10 e 40 ms ed una chiara inibizione per ISI compresi tra 50 e 200 ms. Due studi hanno valutato gli effetti della variazione dell'intensità dello stimolo test, mantenendo costante lo stimolo condizionante (Roick et al. 1993; Triggs et al. 1993a) ed entrambi hanno dimostrato che la LICI era maggiore quando lo stimolo test era debole, solo lievemente soprasoglia, mentre si riduceva (Roick et al. 1993) sino a convertirsi in una chiara facilitazione (Triggs et al. 1993a), se il TS aveva un'alta intensità. Altri studi hanno valutato gli effetti della contrazione muscolare, riportando però risultati contrastanti, che vanno da Uno studio ha infatti mostrato un incremento della LICI nel muscolo attivo rispetto al muscolo rilassato (Claus et al. 1992), un altro non ha mostrato differenze significative (Wassermann et al. 1996), mentre altri due studi hanno mostrato una riduzione della LICI durante contrazione (Triggs et al. 1993a; Nielsen, 1997). Anche per la LICI, nonostante vengano somministrati stimoli soprasoglia, quindi potenzialmente in grado di modificare l'eccitabilità spinale e sottocorticale, esistono evidenze a supporto della natura corticale dell'inibizione osservata ad ISI superiori a 50 ms. La LICI non può essere spiegata solo con un meccanismo periferico,

nonostante sia risaputo che uno stimolo condizionante soprasoglia è capace di indurre un'inibizione dei motoneuroni spinali come dimostrano gli studi che hanno testato sia il riflesso H (Fuhr et al. 1991; Uncini et al. 1993; Ziemann et al. 1993) sia l'onda F (Cantello et al. 1992; Triggs et al. 1993b). Infatti questa inibizione spinale ha una durata di circa 40-100 ms, mentre l'inibizione osservata nella LICI dura fino a 200 ms. Pertanto si può escludere che un meccanismo periferico sia alla base della LICI. A ulteriore conferma che la LICI non è di natura spinale può essere considerato il fatto che i riflessi transcorticali a lunga latenza (LLR), di chiara natura corticale, vengono inibiti per lungo tempo (fino a 160 ms) dopo stimolazione magnetica transcranica. Per ultimo, Nakamura et al. (1997), in registrazioni epidurali a livello cervicale, hanno dimostrato che uno stimolo condizionante soprasoglia come quello utilizzato nel protocollo LICI, è in grado di inibire le scariche corticospinali evocate dallo stimolo test se l'intervallo interstimolo è compreso tra 100 e 200 ms. La LICI presenta molte analogie con il periodo silente corticale, infatti i meccanismi alla base di questi due fenomeni vengono considerati molto simili, entrambi sarebbero mediati da circuiti inibitori GABAergici di tipo B (Roick et al. 1993; Siebner et al. 1998; Werhahn et al. 1999). Tali circuiti non sarebbero comunque identici come dimostrato dagli studi su pazienti affetti da Malattia di Parkinson o distonie, dove è stato osservato un aumento della LICI ed al contrario una riduzione del periodo silente corticale (Berardelli et al. 1996; Valzania et al. 1997; Rona et al. 1998).

1.4. Inibizione afferente a breve e lunga latenza (SAI e LAI).

Recentemente, utilizzando tecniche di TMS a doppio stimolo che sfruttano l'accoppiamento di uno stimolo elettrico periferico con uno stimolo magnetico centrale, si sono messi a punto protocolli in grado di valutare

come gli input sensitivi afferenti dalla mano influenzano sia le reti corticali eccitatorie che inibitorie della corteccia motoria primaria. Per poter osservare questo interessante fenomeno di integrazione sensori-motoria, è indispensabile che la volley afferente e lo stimolo magnetico arrivino alla corteccia motoria in maniera sincronizzata. Per esempio, quando un input afferente viene attivato dalla stimolazione elettrica 25 ms prima che la corteccia motoria sia attivata dallo stimolo magnetico, i MEP indotti dalla TMS risultano depressi in quella che è chiamata “inibizione afferente a breve latenza” o SAI (Tokimura et al., 2000). Siccome anche i volley corticospinali tardivi sono depressi, si ritiene che la SAI avvenga attraverso meccanismi sopraspinali (Tokimura et al., 2000) che coinvolgono sistemi inibitori sia colinergici che GABAergici. Un'altra forma di inibizione afferente della corteccia motoria include l'inibizione afferente a lunga latenza o LAI, che avviene quando l'afferenza periferica viene stimolata 200 ms prima della corteccia stessa, mediante la TMS (Chen et al., 1999; Sailer et al., 2002).

I protocolli a doppio stimolo descritti sopra, prevedono: a) l'applicazione di uno stimolo elettrico della durata di 200 μ s al nervo mediano al polso oppure ai nervi digitali delle dita (indice e medio) della mano, ad un'intensità sufficiente ad evocare una risposta motoria nei muscoli dell'eminenza tenar nel primo caso, oppure pari a 2-3 volte la soglia percettiva nel secondo caso; b) l'applicazione di uno stimolo magnetico all'area motoria primaria (M1) dei muscoli FDI ed ABP (abductor brevis pollicis) ad un'intensità tale da evocare risposte comprese tra i 0,5-2 mV nel muscolo FDI. Come detto sopra, nel protocollo SAI della mano, i MEP sono soppressi quando l'impulso TMS dato alla M1 è preceduto da stimoli elettrici a intervalli interstimolo intorno ai 20 ms, corrispondente alla latenza della prima componente (N20) del potenziale evocato sensitivo

(SEP) del nervo mediano, e intorno a 50 ms. Gli intervalli interstimolo utilizzati nel protocollo LAI variano dai 150 ai 600 ms nei diversi studi (Chen et al., 1999; Classen et al., 2000; Tokimura et al., 2000).

Ci sono ancora dibattiti riguardo la specificità somatotopica dell'integrazione sensori-motoria. Da una parte, studi di risonanza magnetica funzionale hanno dimostrato che i campi recettivi di dita non adiacenti non si sovrappongono nell'area 3b di Brodmann, dove vengono percepiti gli stimoli afferenti (Kurth et al., 2000; Krause et al., 2001; Ruben et al., 2001; van Westen et al., 2004) suggerendo una stretta organizzazione somatotopica. Dall'altro lato, nella aree 1 e 2 di Brodmann, che sono densamente connesse con M1, i campi recettivi delle dita non sono separati (Kurth et al., 2000; Krause et al., 2001). Inoltre, sembra che nella M1 siano rappresentati i movimenti piuttosto che i muscoli (Rizzolatti et al., 1998; Beisteiner et al., 2001; Schieber, 2001; Dechent and Frahm, 2003). Per ciò che riguarda la SAI, alcuni studi hanno suggerito una somatotopia dito-specifica nella mano dell'uomo (Classen et al., 2000; Tamburin et al., 2001), altri implicano un'organizzazione più segmentale (Helmich et al., 2005). A livello degli arti inferiori Roy e Gorassini (2008) hanno dimostrato che la facilitazione delle connessioni del tratto corticospinale era aumentata quando queste venivano attivate a livello di corteccia e non a livello della decussazione piramidale, supportando l'evidenza che la facilitazione del MEP era di origine corticale. Hanno inoltre dimostrato che questa facilitazione era associata con una depressione dei circuiti SICI ed una facilitazione dei circuiti ICF, indotte dallo stimolo afferente. Questo dato suggerisce, inoltre, che le afferenze sensitive della gamba hanno accesso a reti corticali eccitatorie, che mandano sinapsi ai neuroni del tratto piramidale. Per quanto riguarda i fenomeni inibitori dovuti alla stimolazione dell'afferenza dell'arto inferiore, questi autori hanno messo in evidenza che

le risposte elicitate dalla stimolazione della corteccia motoria e del tronco encefalico erano depresse, se tale stimolazione veniva preceduta di circa 35 ms (corrispondenti alla latenza del SEP del nervo tibiale) dall'attivazione degli input afferenti suggerendo che la "SAI nella gamba" avvenisse attraverso meccanismi spinali. Un lavoro successivo di Bikmullina et al. (2009) non ha evidenziato alcuna "SAI" a livello dei muscoli dell'arto inferiore in seguito a stimolazione dei nervi digitali dell'alluce. Quello che questi autori hanno invece evidenziato è una facilitazione delle risposte motorie del muscolo estensore breve delle dita in seguito alla stimolazione afferente, ma nessun effetto sul tibiale anteriore. I diversi risultati ottenuti nell'arto superiore e inferiore, hanno suggerito che le vie cutaneo-motorie di questi due distretti siano organizzate in maniera funzionalmente diversa. Una delle spiegazioni fornita è che gli stimoli esterni applicati al piede hanno un significato biologico diverso rispetto a quelli cutanei delle dita o della mano. Gli ultimi sono fondamentali per il controllo manuale, come ad esempio l'utilizzo di un oggetto. Uno stimolo all'alluce può indurre una risposta di retrazione focale che include l'estensore delle dita ma non il muscolo tibiale anteriore, perché la sua attivazione potrebbe dare instabilità posturale (Bikmullina et al., 2009).

1.5. Potenziamiento a lungo termine e plasticità.

Il potenziamento a lungo termine (LTP) e la depressione a lungo termine (LTD) della trasmissione sinaptica sono tra i modelli fisiologici di formazione della memoria più studiati nel cervello dei mammiferi.

La LTP origina dall'attività sincrona di elementi pre e post-sinaptici che portano ad una facilitazione della trasmissione sinaptica, che dura per ore in vitro e che può persistere per settimane o mesi in vivo (Bliss and Gardner-

Medwin, 1973; Abraham et al., 2002). La LTP è stata dimostrata inizialmente a livello delle sinapsi glutamatergiche tra le fibre della via perforante mediale provenienti dalla corteccia entorinale e dalle cellule a granuli nel giro dentato dell'ippocampo di conigli anestetizzati (Bliss and Lomo, 1973). In seguito, la LTP è stata studiata in una varietà di specie, che andavano dal ratto (Norsten-Bertrand et al., 1996) alla scimmia (Urban et al., 1996), e in numerose e diverse sinapsi a livello del sistema nervoso centrale (SNC), dalla Neocortex (Fox, 2002) sino al midollo spinale (Ji et al., 2003). La maggior parte dei lavori in letteratura sulla LTP è stata condotta in vitro (Skrede and Westgaard, 1971), nella zona CA1 dell'ippocampo. Sin dall'inizio, gli sperimentatori hanno utilizzato treni di stimoli elettrici ad alta frequenza (tetano), rilasciati a livello delle collaterali di Shaffer/fibre commissurali proiettanti da CA3 ai neuroni piramidali di CA1, assicurando un input sinaptico sufficiente ad indurre potenziali d'azione postsinaptici. In esperimenti successivi sono state usate tecniche che accoppiavano la depolarizzazione di una cellula post-sinaptica con una stimolazione simultanea afferente. Questo ha fornito dimostrazione, a livello di singola cellula, del fatto che la coincidenza tra attività pre e post-sinaptica è essenziale per l'induzione di LTP (Gustafsson et al, 1987; Markram et al., 1997; Bi and Poo, 1998). Oltre alla *lunga durata*, la LTP ha altre caratteristiche, che la rendono un candidato ideale per spiegare i meccanismi della memorizzazione di informazioni, caratteristiche che erano già state predette anni prima della sua scoperta da Hebb (Hebb, 1949). Primo, la LTP è un processo input *specifico*, tale che una singola via può essere potenziata senza che ci sia un effetto, sulla medesima cellula, di input circostanti non attivati (Andersen et al., 1980; Barrionuevo and Brown 1983). Considerando che i neuroni corticali possono ricevere migliaia di input sinaptici, questa proprietà può aumentare enormemente la capacità

del cervello di codificare informazioni; se la specificità di vie riflette in realtà una specificità sinaptica, allora l'unità di immagazzinamento delle informazioni potrebbe essere una singola sinapsi. Secondariamente, la proprietà di *associatività* assicura che un tetano debole, che di per sé non è in grado di generare LTP, può venir potenziato attraverso l'associazione con un tetano più forte (McNaughton et al., 1978; Levy and Steward, 1979). Quindi la proprietà dell'associatività si basa su un meccanismo che riconosce un'attività pre e post-sinaptica concomitante. Questa funzione a livello della maggior parte delle sinapsi glutamatergiche del SNC è svolta da una sottoclasse di recettori del glutammato, i recettori per l'N-methyl-D-Aspartato (NMDA) (Collingridge et al., 1983). I recettori NMDA della membrana post-sinaptica legano il glutammato rilasciato nella fessura sinaptica in risposta ad un potenziale d'azione che raggiunge il terminale pre-sinaptico. Questo evento da solo non è in grado di aprire il canale del calcio intrinseco del recettore NMDA poiché, quando il potenziale di membrana si trova intorno a livelli di riposo, il canale è bloccato da ioni magnesio (Nowak et al., 1984). Solo quando la cellula post-sinaptica è sufficientemente depolarizzata lo ione magnesio viene espulso dal canale ionico, permettendo l'ingresso di ioni sodio e calcio nella cellula. Si pensa che sia proprio l'influsso di calcio a generare l'induzione di LTP (Lynch et al., 1983; Malenka et al., 1988). I meccanismi di segnale sensibili al calcio, come la chinasi II calcio/calmodulina dipendente (CaMKII) o le vie dipendenti dall'adenosin-monofosfato ciclico (cAMP) vengono così attivati. Queste molecole danno il via ai meccanismi di espressione della LTP, sia localmente, dove fosforilano recettori e alterano le proprietà intrinseche dei loro canali ionici ligando-dipendenti, o trasmettendo il segnale al nucleo cellulare attraverso fattori di trascrizione per alterare l'espressione genica (Goelet et al., 1986; Alberini et al., 1995). Tali meccanismi possono essere

sia pre che post-sinaptici (Kauer et al., 1988; Malgaroli and Tsien, 1992) e la maggior parte dei lavori al momento si focalizzano sui cambiamenti della conduttanza dei canali dei recettori del glutammato (Derkach et al., 1999; Lee et al., 2003) o sul numero di recettori presente nella membrana sinaptica (Takahashi et al., 2003). Cambiamenti strutturali della forma e del numero delle sinapsi possono inoltre incrementare l'efficacia di vie potenziate (Engert and Bonhoeffer, 1999). Alcuni di questi meccanismi sono ancora controversi e nessuno di essi è stato caratterizzato completamente. Un altro punto importante è che i meccanismi molecolari di induzione e di mantenimento della LTP variano alquanto da sinapsi a sinapsi. Per esempio, a livello dell'ippocampo, alla sinapsi tra fibre muscoidi-cellule piramidali CA3, il recettore NMDA non è necessario per l'induzione di LTP (Harris and Cotman, 1986) e il sito di espressione di LTP è primariamente pre-sinaptico (Weisskopf and Nicoll, 1995). In contrapposizione, l'induzione di LTP è mediata dai recettori NMDA sia a livello delle sinapsi della via perforante mediale-cellule granulari del giro dentato (Morris et al., 1986; Errington et al. 1987) sia delle collaterali di Schaffer-cellule piramidali CA1 (Collinridge et al., 1983). Per di più, c'è una maggior componente di espressione di LTP post-sinaptica a livello di queste ultime (McNaughton, 1982; Manabe et al., 1992; reviewed in Nicoll and Malenka, 1995). Tuttavia, anche questi due set di sinapsi sono dissociabili in termini di meccanismi di segnalazione, giacchè la trasmissione di segnale CaMKII è richiesta per le ultime ma non per le prime componenti (Zhang et al., 2005; Cooke et al., 2004). Non c'è comunque un'immagine generale a supporto dei meccanismi molecolari di induzione ed espressione di LTP a livello delle sinapsi glutammatergiche. Sembra che le più importanti proprietà della LTP come la lunga durata, la

specificità dell'input e l'associatività, possano essere implementate da una varietà di recettori e di sistemi di trasmissione del segnale.

La LTD è il processo inverso alla LTP e risulta in una riduzione di lunga durata dell'efficacia sinaptica. Il protocollo standard per indurre la LTD utilizza lunghi treni di stimoli a bassa frequenza (1 Hz) (Dudek and Bear, 1992), o il disaccoppiamento dei potenziali d'azione pre e post-sinaptici (Markram et al., 1997). È verosimile che ci siano due forme “meccanicamente” differenti di LTD: depressione o depotenziamento, che si riferisce ad un fenomeno opposto a quello della LTP, e una LTD “de novo”, che si riferisce ad una depressione ottenuta su un baseline non potenziato. Alcune forme di LTD sono dipendenti da recettori NMDA e sono innescate da basse concentrazioni di calcio post-sinaptico (Nishiyama et al., 2000). Fosfatasi rispondenti al calcio come la calcineurina e la protein-fosfatasi 1 (PP1) sono implicate come molecole effettrici nei meccanismi di LTD. Queste fosfatasi defosforilano target chinasi, come i recettori del glutammato (Morishita et al., 2005), e le chinasi stesse (Blitzer et al., 1998). La LTD servirebbe come meccanismo omeostatico per assicurare che le sinapsi del SNC non siano saturate dal learning. In alternativa, la LTD può mediare l'apprendimento.

Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS).

Gli studi della LTP nell'uomo sono per ovvie ragioni limitati. Tuttavia, nuove tecniche hanno reso possibile la stimolazione tetanica sull'uomo. Una di queste è la stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS). La maggior parte degli studi di plasticità nell'uomo sono stati condotti sulla corteccia motoria, monitorando l'output motorio e rendendo possibile l'osservazione degli effetti a lungo termine dovuti alla stimolazione ad alta frequenza. La TMS della corteccia motoria dell'uomo, utilizzando

frequenze di 1-20 Hz, produce effetti, sul potenziale motorio evocato, variabili da individuo a individuo. Generalmente la stimolazione a 1 Hz riduce l'attività nervosa, mentre sopra i 5 Hz aumenta l'attività e l'output motorio. In entrambi i casi gli effetti appaiono transitori, con la massima durata di 30 min (Hallet, 2000). L'applicazione della TMS a bassa frequenza alla corteccia motoria primaria, in soggetti sani, può essere usata per bloccare il consolidamento dell'acquisizione di un'abilità motoria, senza interferire con la performance motoria stessa (Muellbacher et al., 2002). Utilizzando treni di stimoli a frequenze più alte di 5 Hz, i cambiamenti del MEP persistono, ma non sono consistenti o non durano mai abbastanza a lungo per essere compatibili con un fenomeno di LTP. Nel soggetto sano è stato provato, e sembra essere innocuo, il tetano ad alte frequenze (50 Hz) con intensità di stimolo inferiore alla soglia motoria, Ma neanche questo tipo di stimolazione induce cambiamenti duraturi (Huang and Rothwell, 2004).

La LTP è stata indotta nell'animale utilizzando treni di stimoli ripetuti ad alta frequenza che mimano il ritmo neurale spontaneo l'onda theta (5-7 Hz). Un tetano di questo tipo (theta burst) può indurre cambiamenti di lunga durata nell'output motorio corticale (Huang et al., 2005). Al momento la stimolazione nell'uomo non supera i 50 Hz e l'intensità di stimolo deve essere ben settata al di sotto della soglia motoria durante il tetano. Tuttavia l'ampiezza del MEP nella mano dopo stimolazione basale soprasoglia può aumentare di circa il 50% per almeno 20 min dopo l'applicazione di stimoli tetanici simili alla theta burst, spazati di 10 secondi. Questi dati dimostrano che la stimolazione magnetica può essere usata per indurre cambiamenti a lunga durata nell'output motorio corticale. Deve essere ancora dimostrato che il sito di tali cambiamenti è la sinapsi.

Stimolazione con corrente diretta transcranica (tDCS)

La polarizzazione con corrente diretta (DC) è iniziata negli anni 60 in una serie di esperimenti sulla corteccia di ratti e gatti (Bindman et al., 1964; Gartside, 1968; Rush e Driscoll, 1968). Questi studi hanno dimostrato che una debole polarizzazione anodica aumenta la frequenza di scarica di neuroni ad attività tonica, mentre la polarizzazione catodica ne riduce la frequenza di scarica. Se la polarizzazione era applicata per diversi minuti, i cambiamenti nella frequenza di scarica persistevano dopo la stimolazione, con una durata strettamente dipendente dall'entità e dal tempo di stimolazione. Allo stesso modo, alcuni studi hanno tentato di applicare la tDCS (intensità: 0,5 mA, attraverso elettrodi di circa 0,5 cm di diametro) all'uomo. I primi protocolli (Priori et al., 1998; Nitsche e Paulus, 2000; Cogiamanian et al., 2007) utilizzavano un elettrodo stimolante sullo scalpo ed un elettrodo di riferimento non cefalico, posizionato sulla spalla o sul ginocchio. Questa metodica aveva l'inconveniente di che la corrente potesse avesse effetto anche sulle strutture profonde del tronco encefalico. Gli ultimi protocolli hanno cercato di evitare la stimolazione di altre strutture posizionando entrambi gli elettrodi sulla testa (Nitsche e Paulus, 2000; Nitsche et al., 2007). Il protocollo più comunemente utilizzato negli studi sull'uomo è stato introdotto da Nitsche e Paulus (2000). Questi autori hanno applicato una corrente di un mA erogata da una sorgente di corrente continua attraverso elettrodi "a spugna" di 35 cm² posizionati sullo scalpo. La densità di corrente utilizzata in questo tipo di stimolazione è così lieve che lo stimolo viene percepito solamente nei primi 30 secondi ed in particolare durante il rapido cambiamento della corrente all'inizio ed alla fine della stimolazione. Questi stessi autori hanno inoltre posizionato un elettrodo sulla M1 ed esplorato varie localizzazioni dello scalpo con il secondo elettrodo, notando che la localizzazione migliore era sulla fronte,

sopra l'orbita controlateralmente alla M1 in cui è posizionato il primo elettrodo. Alcuni autori hanno modificato questi parametri utilizzando routinariamente intensità superiori ai 2 mA per ottenere effetti maggiori (Iyer et al., 2005). Recentemente Nitsche et al. (2007) ha utilizzato elettrodi di dimensioni minori (3.5 cm²) per stimolare la M1 dell'area del muscolo adduttore breve del mignolo (ADM) identificata con la TMS. In questo studio ha dimostrato che la stimolazione con elettrodi di dimensioni minori è in grado di produrre cambiamenti focali nell'eccitabilità della rappresentazione corticale dell'ADM, senza modificare le aree corticali adiacenti (ad esempio la M1 dell'FDI).

Per esaminare come la tDCS modifica la plasticità corticale sono stati eseguiti studi sull'ampiezza dei MEP evocati da un singolo impulso magnetico. I risultati sono stati testati sia durante che dopo la fine della tDCS. In assenza di altri fattori, gli effetti sul MEP sono: aumento del MEP con la tDCS anodica (catodo sulla fronte) e riduzione del MEP con la tDCS catodica (anodo sulla fronte) (Nitsche e Paulus, 2000). Una caratteristica importante della tDCS dal punto di vista della plasticità corticale è che ha un effetto sull'eccitabilità che dura anche oltre il periodo di stimolazione. La durata degli effetti dipende dalla durata di applicazione della tDCS. Cinque minuti di stimolazione generano un cambiamento di ampiezza del MEP che dura cinque minuti, mentre l'applicazione di DC per 10 min ha un effetto che dura per circa 60 minuti. In genere la stimolazione catodica provoca cambiamenti più duraturi rispetto alla stimolazione anodica. La tDCS non ha effetti sui riflessi spinali come il riflesso H o sulle risposte evocate dalla stimolazione elettrica transcranica (TES) della M1, per cui si ritiene che i cambiamenti di ampiezza del MEP avvengano per effetto corticale (Nitsche et al., 2003). La maggior parte degli studi di tDCS hanno utilizzato la M1 del distretto della mano, ma uno studio di Jeffery et al. (2007), che

utilizzava la tDCS nella M1 della gamba, ha dimostrato che questa tecnica può essere utilizzata con successo per modulare la plasticità della corteccia motoria degli arti inferiori posizionando l'elettrodo stimolante 1 cm posteriormente e lateralmente al vertice ed il riferimento controlateralmente sulla fronte. La stimolazione anodica provocava un aumento di ampiezza dei MEP registrati dal muscolo tibiale anteriore. Per contro, la stimolazione catodica non è stata in grado di produrre alcun cambiamento dell'eccitabilità intracorticale (Jeffery et al., 2007). Una possibile spiegazione per questa mancanza di effetto potrebbe essere che i neuroni della corteccia motoria corrispondente all'area della gamba siano orientati in maniera diversa rispetto a quelli dell'area della mano.

Stimolazione associativa accoppiata (PAS).

Un mezzo alternativo alla rTMS per indurre LTP, che non richieda l'applicazione di tetano ad alte frequenze, è accoppiare potenziali d'azione pre e post-sinaptici (Wingstrom et al., 1987, Markram et al., 1997; Bi and Poo, 1998). Accoppiamenti di questo tipo possono essere potenzialmente eseguiti nell'uomo combinando la TMS a bassa frequenza della corteccia motoria, alla stimolazione di un nervo periferico, in una metodica conosciuta come stimolazione associativa accoppiata o PAS. Per esempio, la stimolazione periferica del nervo mediano destro può essere seguita dalla TMS dell'area motoria della mano della corteccia sinistra, ad una latenza determinata dal tempo in cui l'impulso periferico raggiunge la corteccia somatosensoriale (Stefan et al., 2000). L'applicazione di 90-200 coppie di stimolo elettrico e magnetico, ad una frequenza di una doppietta ogni 4-5 secondi, con un ISI di 25 ms è in grado di aumentare l'ampiezza del MEP. L'ampiezza dei MEP viene quindi utilizzata come indice del risultante aumento dell'output motorio corticale.

La stimolazione simultanea, pre e post sinaptica, della corteccia motoria, ottenuta accoppiando la stimolazione elettrica periferica prima della stimolazione magnetica centrale, risulta in un aumento dell'eccitabilità corticale che dura circa un'ora (Stefan et al., 2000), mentre il disaccoppiamento tra stimolazione periferica e TMS, utilizzando intervalli interstimolo di 10 ms, deprime l'eccitabilità corticale per un'ora e mezza (Wolters et al., 2003). Entrambi questi fenomeni possono essere bloccati dal dextrometorfano, un antagonista recettoriale dell'NMDA. Questo dato è in accordo con la teoria del coinvolgimento dei processi simil LTP/LTD. Tuttavia la plasticità è limitata solamente a quelle cellule che ricevono nella corteccia entrambi gli stimoli (periferico e centrale), come dimostrato dal fatto che non c'è potenziamento della risposta motoria nei muscoli controllati da regioni vicine alla corteccia M1, che ricevono lo stimolo magnetico ma non lo stimolo periferico. Quindi l'effetto potenziante è ristretto a quelle cellule che ricevono stimoli accoppiati e sincroni. Recenti studi hanno messo in evidenza che un apprendimento motorio precedente la PAS può prevenire l'induzione della plasticità simil LTP per un tempo di 6 ore (Stefan et al., 2005). Questi dati hanno condotto a pensare che l'apprendimento precoce possa saturare la plasticità, occludendo ulteriori modifiche. Allo stesso tempo, l'induzione di plasticità simil LTD nello stesso periodo è facilitata (Ziemann et al., 2004). Per cui si può dedurre che l'apprendimento motorio aumenta l'output da M1 attraverso processi simil LTP, permettendo nel contempo, di abbassare il livello di saturazione, aumentando quindi le opportunità di apprendimento, attraverso un depotenziamento dell'output motorio.

1.6. Neurofarmacologia della TMS e tDCS.

Per comprendere le basi neurochimiche degli effetti indotti dalla TMS, sono stati condotti numerosi studi in cui essa è stata associata alla somministrazione di vari farmaci attivi sul sistema nervoso centrale, il cui meccanismo d'azione era già stato ben caratterizzato in precedenza. Questi studi hanno permesso di individuare i neurotrasmettitori alla base dei vari circuiti precedentemente descritti.

SICI

Per quanto riguarda la SICI, si ritiene che lo stimolo condizionante sottosoglia attivi un circuito inibitorio a bassa soglia che produce IPSPs nel neurone piramidale inibendo il potenziale d'azione della cellula piramidale indotto dagli EPSPs prodotti dallo stimolo test (Ilic et al. 2002; Kujirai et al. 1993). In accordo con questa ipotesi sono alcuni studi in cui la somministrazione di farmaci agonisti GABA_A determina un incremento della SICI (Di Lazzaro et al. 2000; Ilic et al. 2002; Ziemann et al. 1996b). La tiagabina, un inibitore della ricaptazione del GABA determina invece una riduzione della SICI, secondaria ad una attivazione dei recettori presinaptici GABA_B, presenti sulle terminazioni nervose dei neuroni GABAergici responsabili della SICI stessa ed induce quindi un'autoinibizione del sistema (Werhahn et al. 1999). Comunque sembrerebbe che l'inibizione del MEP condizionato indotta dal protocollo SICI, sia espressione di un equilibrio tra due sistemi: un sistema inibitorio mediato dagli interneuroni GABA_A, che solitamente prevale, ed un sistema facilitatorio che opera agli stessi intervalli interstimolo (SICF) mediato dal glutammato (Ilic et al. 2002). Un decremento dell'attività del sistema facilitatorio spiega perfettamente perché la somministrazione di antagonisti del glutammato inducano un potenziamento della SICI (Ziemann et al. 1998c; Schwenkreis et al. 1999, 2000). La SICI viene potenziata anche da altri neuromodulatori, quali i dopaminoagonisti e gli antagonisti noradrenergici, mentre al contrario viene

ridotta dagli antagonisti della dopamina e dagli agonisti noradrenergici. È da precisare che la modulazione farmacologica della SICI è osservata solo per intervalli interstimolo compresi tra 2 e 5 ms, mentre l'inibizione che si osserva quando i due stimoli sono separati da 1 ms non viene modulata farmacologicamente. Da ciò si evince che esistono almeno due meccanismi che sottendono la SICI, uno responsabile dell'inibizione ad 1 ms, conseguente a verosimile refrattarietà degli elementi neurali attivati dallo stimolo condizionante (Roshan et al. 2003; Fisher et al. 2002; Hanajima et al. 2003) ed il secondo dovuto all'attivazione di un circuito interneuronale inibitorio mediato dai recettori $GABA_A$.

ICF

La fisiologia della ICF, paragonata a quella della SICI, è meno chiara. Si tratta di un circuito intracorticale facilitatorio chiaramente distinto dalla SICI. È comunque probabile che la facilitazione osservata, sia il risultato di un equilibrio tra un forte sistema facilitatorio ed un debole sistema inibitorio, così come osservato nella SICI. L'inibizione sarebbe rappresentata dalla "coda" del sistema GABAergico di tipo A, che negli animali si è dimostrato essere attivo sino a 20 ms (Connors et al. 1988). A conferma di questa ipotesi sono i dati ottenuti nell'uomo sano da Hanajima et al. (1998a). Tali autori hanno osservato che l'inibizione intracorticale alla base della SICI si prolunga sino a 20 ms quando viene utilizzato un orientamento specifico del coil, tale da indurre nell'encefalo una corrente che fluisce in senso anteroposteriore, corrente capace di attivare prevalentemente onde I3. Ed infatti gli agonisti $GABA_A$ riducono la ICF, supportando l'ipotesi dell'equilibrio tra i due sistemi precedentemente formulata (Ziemann et al. 1995, 1996b). Gli EPSPs prodotti dal sistema facilitatorio sembrano essere mediati da recettori per il glutammato NMDA e non NMDA (Hwa and Avoli, 1992). La latenza d'inizio degli EPSPs

mediati dai recettori NMDA è dell'ordine dei 10 ms, in linea con il decorso temporale dell'ICF, come confermano gli studi farmacologici che dimostrano un decremento della ICF conseguente alla somministrazione di antagonisti dei recettori NMDA (Schwenkreis et al. 1999; Ziemann et al. 1998c).

SICF

Anche la SICF viene modulata dai farmaci attivi sul sistema nervoso centrale, anche se a riguardo sono disponibili pochi studi. È stato osservato che gli agonisti GABAergici di tipo A riducono l'entità della facilitazione della SICF, in accordo con l'ipotesi del dualismo tra sistemi eccitatori ed inibitori attivi agli stessi intervalli interstimolo (Ilic et al. 2002; Ziemann et al. 1998b). Gli agonisti dei recettori GABA_B, gli antagonisti dei recettori del glutammato, i bloccanti dei canali del sodio non si sono invece dimostrati efficaci nel modulare la SICF. Nessun farmaco inoltre si è dimostrato capace di modificare gli intervalli interstimolo nei quali si osservano i tre picchi di facilitazione.

LICI

La LICI, come descritto precedentemente, presenta molte similitudini con il periodo silente corticale. Si tratta di un fenomeno di lunga durata mediato probabilmente da IPSPs prodotti da un sistema GABergico di tipo B (Werhahn et al. 1999). Questa ipotesi è supportata da studi farmacologici, che hanno mostrato un incremento dell'inibizione dopo la somministrazione di tiagabina, che esplica la sua azione inibendo il reuptake del GABA (Werhahn et al. 1999), anche se al momento ancora nessuno studio ha valutato il reale effetto degli agonisti GABA_B sulla LICI.

SAI

Per quanto riguarda la SAI, questa è ridotta da farmaci anticolinergici come la scopolamina (Di Lazzaro et al., 2000), dal lorazepam (Di Lazzaro et al.,

2005a), dallo zolpidem (Di Lazzaro et al., 2007). Il diazepam invece aumenta leggermente la SAI (Di Lazzaro et al., 2005a). Gli effetti di diazepam, lorazepam e zolpidem sulla SAI sono dissociati da quelli sulla SICI, la quale è aumentata dal diazepam e lorazepam ma non modificata dallo zolpidem (Di Lazzaro et al., 2007). Questo suggerisce che nella SICI e nella SAI sono coinvolti diversi sottotipi di recettori $GABA_A$ perché lo zolpidem ha affinità preferenziale per la sub unità $\alpha 1$ - del recettore $GABA_A$, mentre lorazepam e diazepam sono considerati come classiche benzodiazepine con azione non selettiva a livello sub unità $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - e $\alpha 5$ -. I diversi effetti delle benzodiazepine sulla SICI e sulla SAI suggeriscono che le misure TMS di inibizione corticale forniscono l'opportunità di distinguere le diverse azioni delle benzodiazepine in diversi circuiti del SNC dell'uomo (Di Lazzaro et al., 2005a; 2007). La soppressione della SAI dovuta alla scopolamina suggerisce che la SAI può essere un utile test per provare l'integrità dei circuiti colinergici centrali, idea supportata a sua volta da un'abnorme riduzione della SAI in pazienti con Alzheimer e demenza a corpi di Lewy (Di Lazzaro et al., 2002; 2005b).

tDCS

La modulazione dei MEP esercitata sia dalla stimolazione catodica che dalla stimolazione anodica è completamente abolita dal destrometorfano, antagonista dei recettori NMDA, ed inoltre può coinvolgere cambiamenti nell'efficacia sinaptica delle proiezioni eccitatorie dirette ai neuroni corticospinali. Tuttavia il destrometorfano non ha alcun effetto durante l'applicazione della tDCS, il che supporta l'idea che la polarizzazione dei neuroni è l'effetto chiave esercitato della TMS in questo periodo (Paulus et al., 2008). La carbamazepina, antagonista dei canali del sodio, blocca gli effetti della tDCS anodica sui MEP, sia durante la somministrazione della DC, che nel periodo successivo. Questo potrebbe essere compatibile con

l'idea che la tDCS anodica depolarizzi i neuroni, aumentando l'influsso di calcio. Tuttavia questo farmaco non ha alcun effetto sulla tDCS catodica (Liebetanz et al., 2002), suggerendo che probabilmente questa richiede un'iperpolarizzazione della membrana potassio-dipendente. Non ci sono inoltre influenze sull'effetto della tDCS utilizzando serotonina, acetilcolina e dopamina.

PAS

La modulazione farmacologica della plasticità simil LTP indotta dalla PAS è stata poco studiata. Precedenti studi a livello cellulare hanno dimostrato che vari neurotrasmettitori come la dopamina (DA), la norepinefrina (NE) e l'acetilcolina (ACh) possono influenzare significativamente l'espressione di LTP (Gu, 2000, 2003; Otani et al., 2003). Per quanto riguarda il sistema dopaminergico, la levodopa aumenta l'entità e la durata dell'effetto della LTP (Kuo et al., 2008) ma non più quando i recettori D2 sono bloccati dal sulpiride (Nietsche et al., 2009). D'altra parte, il ropirinolo, agonista per i recettori D2, riduce la LTP indotta dalla PAS in maniera dose-dipendente (Monte-Silva et al., 2009). La cabergolina, agonista dei recettori D2, non ha invece alcun effetto modulatorio sulla LTP, mentre l'aloiperidolo (antagonista D2) sembra avere un effetto soppressivo sulla LTP indotta dalla PAS (Korchounov and Ziemann, 2011). Considerando il fatto che la sulpiride (antagonista selettivo dei recettori D2) aumenta lievemente la LTP (Nietsche et al., 2009), il chiaro effetto soppressivo dell'aloiperidolo può essere spiegato tenendo in considerazione le differenze tra questi due farmaci. Una ragione può essere la bassa affinità della sulpiride rispetto all'aloiperidolo, a livello dei recettori D2 (Matsubara et al., 1993). In aggiunta, l'aloiperidolo inibisce il recettore NMDA contenente le sub unità NR1/2B (Ilyin et al., 1996; Shim et al., 1999) ma non i recettori NMDA

contenenti la sub unità NR1/2A. La plasticità simil LTP indotta dalla PAS è NMDA dipendente, perché può essere bloccata dal destrometorfano, un antagonista non competitivo di questi recettori (Stefan et al., 2002). Inoltre, i recettori NMDA contenenti le sub unità NR1/2B, piuttosto che NR1/2A, favoriscono l'induzione di LTP (Philipot et al., 2001). Un'altra caratteristica che contraddistingue l'aloiperidolo dalla sulpiride è la capacità di legarsi e bloccare i recettori α 1-adrenergici corticali (Cohen and Lipinski, 1986; Patel et al., 2001). È possibile che il blocco dei recettori α 1-adrenergici corticali da parte dell'aloiperidolo contribuisca al suo effetto soppressivo sulla LTP (Korchounov and Ziemann, 2011). Questi dati implicano che è necessaria una co-attivazione bilanciata dei recettori D1 e D2 della dopamina per aumentare la LTP indotta dal protocollo PAS. Nel sistema colinergico, la rivastigmina, inibitore della colinesterasi, aumenta enormemente la grandezza e la durata della plasticità simil LTP (Kuo et al., 2007), mentre la tacrina (agonista colinergico) non provoca alcun aumento di LTP indotta dalla PAS (Korchounov and Ziemann, 2011). La differenza tra i due farmaci è correlata alla loro potenza nel ridurre il rilascio di ACh, attraverso un'autoinibizione pre-sinaptica. Questa auto inibizione del rilascio di ACh da parte della tacrina avviene nel SNC a concentrazioni verosimilmente raggiunte da dosi terapeutiche di questo farmaco (Jackisch et al., 2009). Invece la nicotina provoca un prolungamento, non significativo, della LTP ma non ha alcun effetto sulla grandezza dell'effetto (Thirugnanasambandam et al., 2011). Il biperiden (antagonista dei recettori muscarinici M1) ha invece un effetto soppressivo sulla plasticità simil-LTP indotta dalla PAS (Korchounov and Ziemann, 2011). Questo avverrebbe attraverso meccanismi di co-localizzazione dei recettori muscarinici M1 con i recettori NMDA e successivo potenziamento delle correnti dei recettori NMDA, dovuto all'attivazione dei recettori muscarinici (Marino et al.,

1998). Infatti quando si ha un'aumento nella neurotrasmissione muscarinica M1, risultano facilitate alcune forme di LTP dipendenti dai recettori NMDA a livello corticostriatale ed ippocampale, mentre il blocco dei recettori M1 sopprime queste forme di LTP (Calabresi et al., 1999; Ovsepian et al., 2004). Per quanto riguarda il sistema adrenergico, il metilfenidato, agonista indiretto della norepinefrina) non ha alcun effetto sulla LTP (Korchounov and Ziemann, 2011) nonostante la stessa molecola aumenti la LTP nell'ippocampo del ratto (Dommett et al., 2008). La prazosina, antagonista selettivo dei recettori α 1-adrenergici, sopprime gli effetti della LTP indotta dalla PAS nonostante il meccanismo coinvolto in questa soppressione sia ancora sconosciuto (Korchounov and Ziemann, 2011). In conclusione, la plasticità simil-LTP nella corteccia motoria dell'uomo è facilmente soppressa da antagonisti dei maggiori sistemi di neurotrasmettitori neuro modulatori, mentre un aumento della plasticità LTP è più difficile da ottenere. Questo perché potrebbe entrare in gioco un meccanismo di saturazione della LTP.

2. IL SISTEMA MOTORIO FACCIALE.

La quasi totalità degli studi di TMS a singolo o a doppio stimolo condotti sull'uomo sono stati effettuati utilizzando come modello la rappresentazione corticale dei muscoli della mano e registrando solitamente dal muscolo FDI e dai muscoli dell'eminenza tenar e ipotenar. Cio è dovuto al fatto che la rappresentazione corticale della mano è piuttosto estesa ed infatti, la stimolazione di queste aree permette di ottenere facilmente un MEP da questi muscoli, sia in condizioni di riposo che durante contrazione. Inoltre l'alta complessità dei movimenti eseguibili dalle mani presuppone che i sistemi di controllo intracorticali o di integrazione sensorimotoria,

siano essi inibitori o facilitatori, siano altamente rappresentati in queste aree. Negli ultimi dieci anni l'attenzione si è estesa anche allo studio dell'eccitabilità intracorticale di altre rappresentazioni motorie come quelle dei muscoli prossimali degli arti superiori (Chen et al. 1998; Abbruzzese et al. 1999), dei muscoli degli arti inferiori (Stokic et al. 1997, Chen et al. 1998; Tergau et al. 1999; Di Lazzaro et al. 2001; Soto et al. 2006), del tronco (Chen et al. 1998;) e del distretto cranio-cervicale (collo: Hanajima et al. 1998b; lingua: Muellbacher et al. 2001; muscoli facciali: Kobayashi et al. 2001, Paradiso et al. 2005; muscolo digastrico anteriore: Jaberzadeh et al. 2007; muscolo massetere: Ortu et al. 2008). I risultati ottenuti hanno dimostrato che in tutte queste rappresentazioni, il comportamento e la funzione dei circuiti intrinseci della corteccia motoria erano sostanzialmente uguali a quelli osservati nei muscoli della mano nella condizione di riposo, mentre sono contrastanti i dati ottenuti sulla muscolatura volontariamente attiva. Lo studio dell'integrazione sensorimotoria e della plasticità corticale ha sempre utilizzato come modello la muscolatura della mano, nello specifico i muscoli FDI e abduktore breve del pollice (APB). Solo recentemente sono stati studiati protocolli che testassero gli effetti della stimolazione sensitiva sull'output motorio di altri distretti come gli arti inferiori (Roy and Gorassini, 2008; Bikmullina et al., 2009) e gli effetti di protocolli di stimolazione associativa sui muscoli della gamba (Stinear and Hornby, 2005; Prior and Stinear, 2006; Mrachacz-Kresting et al., 2007; Roy et al., 2007) sulla plasticità corticale di queste aree.

Per quanto riguarda gli effetti della stimolazione periferica sull'output motorio facciale e lo studio della plasticità corticale mediante protocolli TMS, non ci sono lavori in letteratura che descrivano questi fenomeni, molto probabilmente per le peculiari caratteristiche della muscolatura facciale che saranno esposte in dettaglio nel paragrafo successivo.

2.1. I muscoli facciali.

I muscoli del capo possono essere suddivisi in due gruppi: cranio-facciali e masticatori (Grey's Anatomy, 2005). Con il termine di muscoli cranio-facciali ci si riferisce ai muscoli correlati alle espressioni facciali, come quelli delle palpebre e del margine orbitario, i muscoli esterni del naso e narici, delle labbra, delle guance e della bocca, dello scalpo e della cute cervicale. I muscoli masticatori invece sono correlati primariamente ai movimenti dell'articolazione temporomandibolare con funzione soprattutto di masticazione e deglutizione. L'organizzazione dei muscoli facciali differisce da quella dei muscoli delle altre regioni del corpo perché non c'è fascia profonda membranosa nella cute, ed i fasci di muscolo attaccati allo scheletro facciale si inseriscono poi direttamente sulla cute. I muscoli cranio-facciali sono innervati dal nervo facciale, mentre i muscoli masticatori sono innervati dalla branca mandibolare del nervo trigemino. L'innervazione sensitiva è principalmente di pertinenza trigeminale. I muscoli facciali possiedono pochi o nessun fuso neuromuscolare (Voss, 1956; Lovell et al., 1977), non agiscono su articolazioni e sono privi di recettori profondi, come gli organi tendinei o i recettori articolari, e di fibre nervose afferenti muscolari (Connor and Abbs, 1998; Cruccu et al., 1997; Lin and Sessle, 1995; Nordin and Hagdarth, 1986, 1989; Popelle, 1993; Trulsson and Johansson, 2002; Yildiz et al., 2007). In particolare, nel sistema periorale, mancano di recettori muscolari (Folkens and Larson 1978; Stål et al., 1987, 1990) e questi muscoli non traggono beneficio dagli input visivi per il controllo dei movimenti articolari” (Ito and Ostry, 2010).

È stato inoltre riportato che i meccanocettori ritrovati nella cute facciale e nella mucosa orale provvedono al trasporto dell'informazione cinestetica e

propriocettiva dei movimenti oro-facciali (Connor and Abbs, 1998; Johansson et al., 1988; Lin and Sessle, 1994; Trulsson and Johansson, 2002).

-IL MUSCOLO DEPRESSORE DELL'ANGOLO DELLA BOCCA (DAO).

Il muscolo depressore dell'angolo della bocca o DAO, ha un'origine lineare piuttosto lunga, a partire dal tubercolo mentale della mandibola e prosegue per la sua continuazione, la linea obliqua, al di sotto e lateralmente al depressore del labbro inferiore. Poi converge in uno stretto fascicolo che si mescola a livello dell'angolo della bocca con i muscoli orbicolare della bocca e risorio. Alcune fibre continuano nel muscolo elevatore dell'angolo della bocca. Il DAO confina nella parte inferiore con il platisma e la fascia cervicale. Alcune fibre possono oltrepassare in basso il tubercolo mentale ed incrociarsi con quelle del muscolo contro laterale. Il DAO è innervato dalle branche mandibolare e buccale del nervo facciale. Le azioni di questo muscolo sono di tendere l'angolo della bocca verso il basso e lateralmente ed esprimere tristezza.

2.2. I nuclei motori facciali

Il nucleo motorio facciale è localizzato nella regione ventrolaterale inferiore del ponte (Rev. in: Grey's Anatomy, 2005; Carpenter e Sutin, 1989; Morecraft et al., 2004). Istologicamente il nucleo facciale appare come un complesso organizzato di cellule, suddivisibile in quattro subnuclei. Questi includono i subnuclei mediale, laterale, dorsomediale ed intermedio. In termini di organizzazione muscolotopica, è classicamente ritenuto che i motoneuroni nella metà superiore del nucleo facciale diano origine ad

assoni che innervano la muscolatura inferiore della faccia, mentre gli assoni per la muscolatura superiore del volto avrebbero origine dai motoneuroni della metà inferiore del nucleo facciale. Tuttavia, recenti evidenze neuroanatomiche hanno suggerito che la suddivisione muscolotopica del nervo facciale è organizzata in colonne. Per esempio, i neuroni motori del subnucleo intermedio innervano il muscolo orbicolare dell'occhio, mentre i motoneuroni che innervano il ventre del muscolo occipitofrontale risiedono primariamente nel subnucleo dorsomediale. La muscolatura auricolare è rappresentata nel subnucleo mediale e la muscolatura della zona periorale è rappresentata nel subnucleo laterale. Il subnucleo laterale, a sua volta, può essere ulteriormente suddiviso. I neuroni motori che innervano i muscoli del labbro superiore sono localizzati nella regione dorsale del subnucleo laterale, mentre i motoneuroni che innervano la muscolatura del labbro inferiore hanno origine dalla regione ventrale del subnucleo laterale. Il nucleo facciale riceve fibre cortico-bulbari per il controllo volontario. I neuroni che innervano la muscolatura superiore della faccia e dello scalpo ricevono fibre corticobulbari bilaterali, mentre si pensa che i neuroni che forniscono l'innervazione ai muscoli inferiori del viso ricevano solamente un'innervazione controlaterale. Il nucleo facciale riceve inoltre fibre dal tratto rubro-reticolare ipsilaterale e afferenze dalla sua radice sensitiva (attraverso il nucleo solitario) e dal nucleo spinale trigeminale. Alcune fibre efferenti del nervo facciale originano dai neuroni nel nucleo salivatorio inferiore, localizzato nella formazione reticolare dorso laterale alla parte caudale del nucleo motorio. Questi neuroni pregangliari parasimpatici appartengono alla colonna efferente viscerale generale. Questi emettono le loro fibre nella radice sensitiva del nervo facciale.

2.2. La corteccia motoria facciale.

Si ritiene che la muscolatura facciale sia sottoposta a controllo volontario attraverso vie cortico-bulbari dirette ed indirette ai nuclei dei nervi facciali (Brodal, 1981; Rinn, 1984). Considerato che la muscolatura superiore della faccia è risparmiata in pazienti con lesioni emisferiche, si pensa che la muscolatura facciale superiore riceva una innervazione corticale bilaterale (Brodal, 1981). Tuttavia è controverso il fatto che ci siano proiezioni provenienti dalla corteccia motoria primaria (M1) alla muscolatura facciale superiore nell'uomo. Esperimenti condotti sulle scimmie da Morecraft e collaboratori (2004) hanno evidenziato la presenza di almeno cinque rappresentazioni corticali della faccia, ed ognuna di queste rappresentazioni era associata a cinque diverse aree motorie corticali (figura 3):

1. Corteccia motoria primaria (M1)
2. Corteccia premotoria ventrolaterale (LPMCv)
3. Corteccia motoria supplementare (M2)
4. Corteccia motoria del cingolo rostrale (M3)
5. Corteccia motoria del cingolo caudale (M4).

Tra queste, la M1 innerva preferenzialmente solo il nucleo facciale controlaterale. In maniera analoga, anche la LPMCv ed M4 proiettano principalmente al subnucleo laterale controlaterale, il quale innerva la muscolatura periorale. La M3 proietta bilateralmente ai nuclei facciali che innervano la muscolatura superiore della faccia (figura 4).

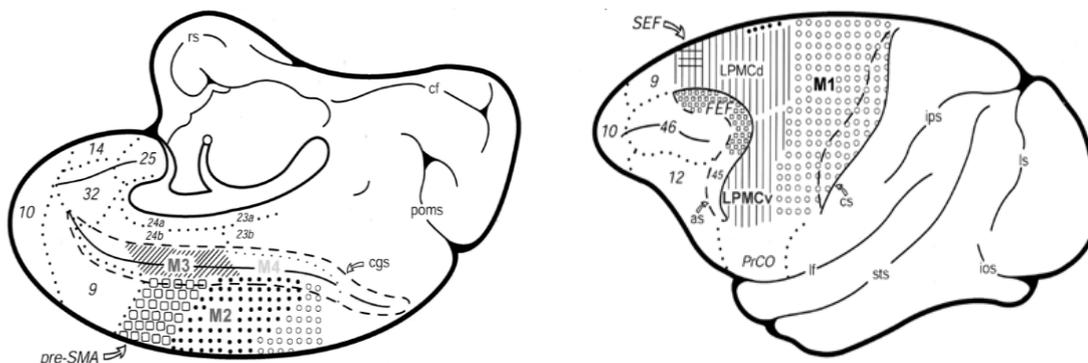


Figura 3

Diagramma schematico delle superfici mediale (sinistra) e laterale (destra) delle superfici della corteccia cerebrale di scimmia rhesus che mostra l'organizzazione del lobo frontale e della corteccia cingolata. M1, corteccia motoria primaria; M2 corteccia motoria supplementare; M3, corteccia motoria del cingolo rostrale; M4, corteccia motoria del cingolo caudale; LPMCd, corteccia premotoria laterale dorsale; LPMCv, corteccia premotoria laterale ventrale; FEF, regioni oculari frontali; SEF, regioni oculari supplementari. Da: Morecraft et al. *Brain*. 2001.

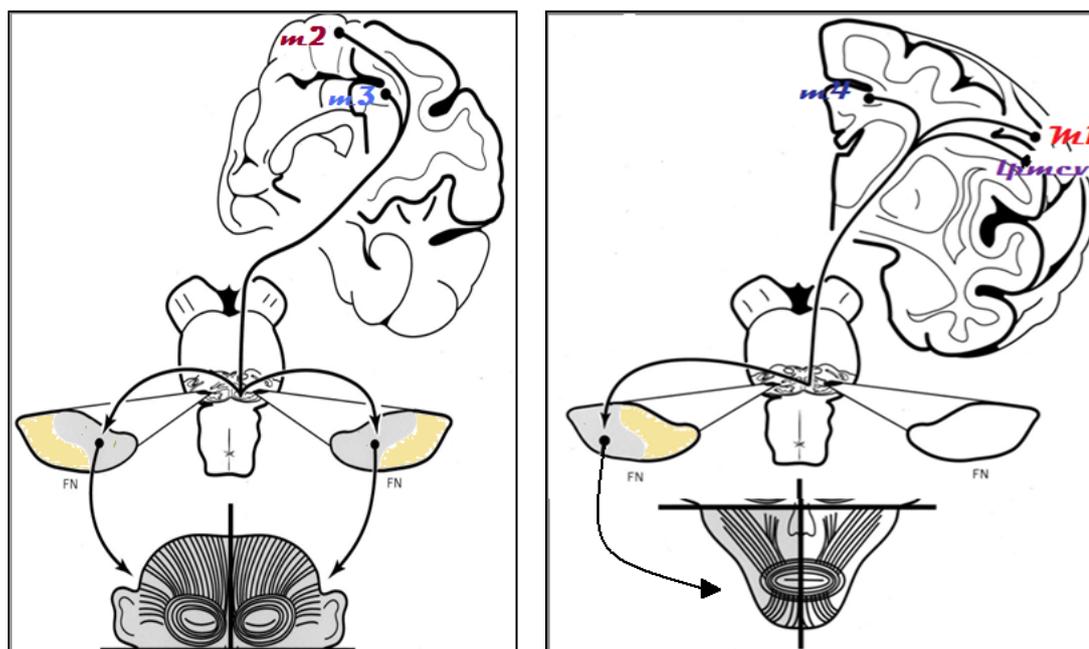


Figura 4

Diagramma che riassume i maggiori pattern di proiezione, determinati dalla densità assonale, per le rappresentazioni facciali frontale e cingolata al nucleo facciale in scimmie rhesus. L'innervazione della parte superiore della faccia origina principalmente dalla M2 ed M3 ed è bilaterale (sinistra). Per contro, l'innervazione dei muscoli inferiori del viso è controlaterale ed origina primariamente da M1, da LPMCv e da M4 (destra). FN, nucleo facciale. Da: Morecraft et al. *Brain*. 2001.

Nell'uomo l'anatomia delle vie cortico-facciali non è stata studiata in dettaglio e le aree corticali che controllano i muscoli facciali rimangono controverse. Data la complessità delle espressioni facciali nell'uomo, non si possono paragonare direttamente i dati ottenuti sui primati non umani.

Anche se alcuni autori hanno riportato risposte nei muscoli facciali superiori ed inferiori utilizzando la TMS dell'area M1 facciale, le latenze delle risposte erano circa 11ms, e queste latenze delle risposte sono significativamente maggiori per i muscoli facciali rispetto ai muscoli degli arti superiori o dei muscoli innervati da altri nervi cranici (circa 6-8 ms) (Benecke et al., 1988; Cruccu et al., 1990b, 1997; Kobayashi et al., 2001). Questi stessi autori hanno suggerito che la M1 proietta controlateralmente ai muscoli facciali. Tuttavia queste latenze del MEP erano simili alla prima componente (R1) del blink reflex (Benecke et al., 1988; Kimura, 1989; Esteban, 1999). Sohn et al. (2004) in uno studio in cui la TMS veniva applicata in posizione medio-frontale, in modo da stimolare la corteccia mesiale frontale ed evitare l'attivazione della M1, hanno evocato risposte nell'orbicolare dell'occhio con latenze che andavano da 6 a 8 ms le quali sono state interpretate come MEPs. Per cui questi autori hanno suggerito che la corteccia mesiale frontale proietti direttamente ai muscoli facciali e che i MEPs ottenuti nell'orbicolare dell'occhio per stimolazione di M1 potessero essere spiegati dalla componente R1 del blink reflex piuttosto che da una proiezione corticale (Sohn et al., 2004). Invece studi che utilizzavano il paradigma TMS a doppio stimolo hanno messo in evidenza che i muscoli inferiori della faccia seguivano gli stessi pattern eccitatori ed inibitori della muscolatura della mano (Kobayashi et al., 2001; Paradiso et al., 2005). Il gruppo di Kobayashi nello stesso studio sulla muscolatura superiore del volto ha evidenziato che i muscoli superiori della faccia non mostravano inibizione intracorticale e una ridotta facilitazione. Questi autori

suggerivano che i movimenti della parte superiore del viso erano in gran parte modulati da proiezioni tronco encefaliche (Kobayashi et al., 2001). Paradiso et al. hanno messo in evidenza la presenza di SICI ed ICF anche a livello del muscolo orbicolare dell'occhio controlaterale, mentre per la risposta ipsilaterale non sono stati in grado di dare informazioni conclusive perché inficiata dalla componente R1 del blink reflex. Questi autori hanno dato prova dell'origine corticale della risposta evocata dalla TMS e suggerito che la M1 da origine ad un risposta controlaterale nella muscolatura superiore ed inferiore della faccia. Hanno inoltre escluso che il MEP ottenuto controlateralmente fosse dovuto ad un blink reflex poiché la componente R1 si manifesta ipsilateralmente al lato di stimolazione e non controlateralmente, e spostando il coil anteriormente, in una posizione che avrebbe dovuto evocare più facilmente un blink reflex, il MEP si riduceva di ampiezza sino a scomparire (Paradiso et al., 2005). Per quanto riguarda i muscoli masticatori, il controllo da parte della corteccia motoria M1 è bilaterale (Kuypers, 1958; Iwatsubo et al., 1990; Gooden et al., 1999; Nordstrom et al., 1999; Butler et al., 2001; Guggisberg et al., 2001) ma non simmetrico, avendo l'emisfero controlaterale una maggiore influenza eccitatoria (Cruccu et al., 1989; Pearce et al. 2003; Nordstrom, 2007; Ortu et al., 2008). Per i muscoli facciali invece, non si è riusciti a chiarire la natura delle proiezioni cortico-facciali ipsilaterali. Studi TMS che hanno utilizzato la registrazione con elettrodi ad ago, per evitare cross-talk con il muscolo controlaterale, hanno riportato la presenza di MEP ipsilaterali nei muscoli inferiori della faccia (Benecke et al., 1988; Werhahn et al., 1995; Rodel et al., 1999). Inoltre il gruppo di Werhahan ha dimostrato la presenza del periodo silente nel muscolo mentale ipsilaterale. Tuttavia studi di stimolazione elettrica diretta sulla corteccia motoria umana hanno messo in evidenza una contrazione bilaterale nei muscoli superiori della faccia e solo movimenti

controlaterali nella muscolatura inferiore (Penfield and Rasmussen, 1950), e altri studi TMS non hanno evidenziato risposte ipsilaterali nei muscoli inferiori del viso (Cruccu et al., 1990a) oppure la risposta ipsilaterale era visibile solo in una parte dei soggetti studiati, e quando presente, aveva la stessa latenza rispetto alla risposta controlaterale ma un'ampiezza ridotta. Questo dato ha fatto concludere che le risposte ipsilaterali registrate fossero dovute a volume condotto dalla muscolatura controlaterale (Paradiso et al., 2005). In uno studio successivo condotto in pazienti con parasi periferica del nervo facciale, Yildiz et al. (2007) hanno trovato un aumento significativo dei MEP registrati nei muscoli periorali intatti stimolando con la TMS l'emisfero controlaterale al lato paretico. Questo dato ha suggerito che in pazienti con paralisi facciale periferica la corteccia ipsilaterale è in grado di attivare maggiormente i muscoli periorali intatti, aumentando la forza delle connessioni ipsilaterali (Yildiz et al., 2007).

I muscoli facciali rispondono inoltre alle influenze emotive, che sono apparentemente mediate da vie sottocorticali diverse da quelle cortico-bulbari che mediano il controllo volontario dell'attività dei muscoli facciali (Monrad-Krohn, 1924; Karnosh, 1945; Lees, 1988). La dissociazione tra movimenti volontari ed emotivi (o "spontanei") può avvenire in pazienti con lesioni sopranucleari, confermando che i movimenti volontari ed i movimenti "spontanei" sono mediati da diverse vie discendenti (Hopf et al., 1992). Questo duplice controllo dei muscoli facciali, clinicamente manifesto con la dissociazione dei movimenti facciali volontari ed emotivi, è ormai riconosciuto da molti anni. Il deficit è comunemente attribuito ad un danno che compromette sia l'area facciale della M1 o le sue proiezioni discendenti, le quali innervano il nucleo facciale. In aggiunta, questo deficit può essere associato con un danno dell'area facciale della LPMCv, che da origine alle proiezioni controlaterali ai muscoli facciali in primati non umani

(Morecraft et al., 2001). In genere, il sorriso associato a stimoli emotivi è preservato e le proiezioni cortico-facciali da M4 possono giocare un ruolo nel recupero della paresi volontaria della muscolatura periorale contralaterale. Questa teoria è basata sulla topografia delle proiezioni corticofacciali dalla M4 ed il ritrovamento che la M4 è un recipiente di input dal lobo limbico esteso e potente. In contrasto alla più comune forma di paresi facciale volontaria, c'è la condizione inversa chiamata paralisi facciale "emotiva". Nello specifico, questo disordine è caratterizzato da un disturbo nel sorridere da un lato della faccia in presenza di un completo controllo volontario sugli stessi muscoli facciali. La paralisi facciale "emotiva" è stata riportata in pazienti con danno della corteccia nella linea mediana, dell'insula, talamo, regione striato-capsulare e ponte (Laplaine et al., 1977; Damasio, 1994; Hopf et al., 1992, 2005; Urban et al., 1998). Si pensa che l'elaborazione dell'espressione facciale avvenga attraverso sistemi multipli che interagiscono tra loro, che comprendono le cinque aree corticali facciali, aree della corteccia parietale e strutture nervose corticali e subcorticali che sono direttamente o indirettamente interconnesse con ciascuna delle rappresentazioni facciali corticali. Damasio (1994) ha suggerito che la corteccia del cingolo anteriore può mediare i movimenti della muscolatura superiore del viso associati all'emotività, e la corteccia frontale laterale può mediare i movimenti volontari della muscolatura inferiore. La topografia delle proiezioni corticofacciali da M3, ed il fatto che M3 sia sede di estesi input limbici e prefrontali, supporta questa idea. È anche importante far notare che siccome la regione laterale della corteccia motoria primaria ed il cingolo anteriore sono interconnesse, è probabile che ci sia una sovrapposizione funzionale tra circuiti volontari ed emotivi a livello sia corticale che sottocorticale attraverso sistemi di proiezione laterali frontali e dal cingolo anteriore (a livello di target subcorticali comuni come

il talamo ed i gangli della base). In questo paragrafo ci siamo concentrati sulla corteccia, ma bisogna ricordare l'importanza della strutture sottocorticali nel mediare l'espressione facciale. Le strutture maggiori dovrebbero includere i gangli della base, il talamo, l'ipotalamo, il grigio periacqueduttale, il complesso trigeminale e la formazione reticolare (Jenny and Saper, 1987; Hostelge et al., 1977, Hostelge, 1996, 2002; Evinger et al., 2002). Questo trova supporto dalla costellazione di lesioni subcorticali che sono state riportate dare origine a deficit sia nelle forme volontarie che emozionali di espressione facciale (Weddel et al., 1990; Ross and Mathiesen, 1998; Urban et al., 1998, 1999; Hopf et al., 1992; Parvizi et al., 2001). Come accade in un'orchestra sinfonica, solo quando presi insieme, i contributi di ciascuna componente agiscono in maniera ottimale ed armonica sui motoneuroni che formano il nucleo motorio facciale per dare origine alle espressioni facciali.

STUDIO 1

I circuiti intracorticali inibitori e facilitatori a breve latenza nella corteccia motoria facciale

1. OBIETTIVI

La possibilità di esplorare la funzionalità dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori mediante la tecnica della TMS a doppio stimolo, ha permesso di fare passi da gigante nella conoscenza dei meccanismi alla base del controllo del movimento volontario e della fisiopatologia dei disturbi del movimento. Il distretto motorio facciale, per la sua complessità morfo-funzionale è tecnicamente difficile da studiare e mal si presta come modello per gli studi di TMS. Benché con la TMS a singolo stimolo siano state definite le caratteristiche dei MEP registrati dai muscoli orbicolare dell'occhio, orbicolare della bocca, mentale, nasale, depressore dell'angolo della bocca e muscoli della lingua, in termini di latenza, e ampiezza (Benecke et al., 1988; Cruccu et al., 1990b, 1997; Dubach et al., 2004; Rösler et al., 1989; Cruccu et al., 1997; Liscic et al., 1998 Muellbacher et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Triggs et al., 2005; Paradiso et al., 2005) non ci sono dati conclusivi sulla bilateralità ed asimmetria della risposta e non è ancora chiaro come la SICI e la ICF operino nella corteccia motoria facciale, in condizioni di riposo e di attivazione muscolare volontaria. Per quanto riguarda la dominanza emisferica ci sono studi che suggeriscono

una dominanza dell'emisfero sinistro per la produzione verbale e il ruolo preponderante della M1 anche per semplici task verbali (Wildgruber et al., 1996). Triggs et al.(2005) (ANNO), basandosi sulla concezione che le emozioni sono espresse maggiormente dal lato sinistro del viso (Sackeim et Al, 1978), , hanno invece dimostrato che i MEP evocati nel muscolo orbicolare della bocca di sinistra sono più ampi rispetto a quelli evocati nel muscolo destro, sia per stimolazione dell'emisfero destro che dell'emisfero sinistro ed inoltre, la differenza in ampiezza tra muscolo destro e sinistro era più evidente quando si stimolava l'emisfero destro (Triggs et al., 2005). Recentemente, studi di eccitabilità corticale che utilizzavano il paradigma della TMS a doppio stimolo, hanno dimostrato la SICI e la ICF nella rappresentazione corticale del muscolo orbicolare dell'occhio (Paradiso et al., 2005), del muscolo mentale (Kobayashi et al., 2001), del muscolo depressore dell'angolo della bocca (Paradiso et al., 2005) e della lingua (Muellbacher et al., 2001) a riposo, mentre i dati ottenuti durante attivazione muscolare sono tuttora controversi. Uno studio sull'eccitabilità intracorticale della corteccia motoria della lingua ha paragonato gli effetti di diversi stimoli condizionanti (CS) e stimoli test (TS) durante il 10% della massima contrazione volontaria (MVC). I CS erano l'80% e il 90% della soglia motoria attiva (AMT), mentre i TS erano settati per evocare MEP tra i 400-800 μ V (basso TS) oppure 800-1500 μ V (alto TS). La combinazione di CS 80% con basso ed alto TS era in grado di elicitarne solamente la SICI mentre la ICF non era significativa. Al contrario, la combinazione "basso ed alto TS" con un CS 90% era in grado di elicitarne sia SICI che ICF. Paragonando le SICI ottenute con i diversi CS è stato evidenziato che il CS 80% induceva un'inibizione maggiore rispetto al CS 90%. Al contrario, il CS 90% era l'unico efficace nell'indurre facilitazione del MEP (Muellbacher et al., 2001). A livello del muscolo orbicolare dell'occhio, un primo lavoro di

Kobayashi et al (2001) che utilizzava come CS il 90% della AMT non aveva messo in evidenza alcun effetto inibitorio a breve latenza e una lieve facilitazione intracorticale sulla muscolatura in attivazione muscolare (chiusura leggera dell'occhio). Pochi anni dopo Paradiso e collaboratori (2005) utilizzando come CS il 95% della AMT, hanno dimostrato la presenza della SICI ma non della ICF nell'orbicolare dell'occhio in attivazione. Tuttavia utilizzando gli stessi parametri, questi autori non hanno evidenziato alcuna SICI nè ICF sul muscolo DAO in attivazione (Paradiso et al., 2005).

Sulla base di quanto detto sopra, sono stati definiti gli obiettivi principali dello STUDIO 1 come segue: (a) dare un contributo, alla materia ancora controversa, della asimmetria delle proiezioni cortico-facciali; (b) studiare l'eccitabilità intracorticale della corteccia motoria facciale applicando i vari protocolli di TMS a doppio stimolo utilizzati per lo studio dell'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e della facilitazione intracorticale (ICF), sia a riposo che durante contrazione muscolare, utilizzando diversi stimoli condizionanti; (c) chiarire una possibile dominanza emisferica nel controllo della muscolatura facciale.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Soggetti.

Lo studio è stato condotto su 19 volontari sani (10 maschi e 9 femmine) con età media di 34.1 ± 8.3 anni. Tutti i soggetti eccetto uno erano destrimani e avevano un'anamnesi negativa per malattie neurologiche e/o malattie dell'apparato stomatognatico. Il protocollo sperimentale, approvato dal comitato etico locale, era in accordo con i principi etici stabiliti dalla dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti hanno fornito

per iscritto il consenso informato alla partecipazione allo studio e nessuno durante gli esperimenti ha manifestato effetti collaterali.

In ogni sessione sperimentale ai soggetti, seduti su una sedia confortevole, veniva chiesto in un primo momento di mantenere la muscolatura del volto completamente rilassata mentre in seguito veniva chiesto loro di contrarre i muscoli DAO in maniera costante e simmetrica ad un livello prestabilito (10% della massima contrazione volontaria, MVC). A tal fine veniva fornito un feedback visivo, mostrando sullo schermo di un'oscilloscopio l'attività elettromiografica (EMG) filtrata e rettificata di entrambi i muscoli DAO.

2.2. Registrazione dell'attività EMG.

I potenziali evocati motori sono stati registrati da entrambi i muscoli DAO attraverso elettrodi di superficie standard (Ag–AgCl). Esperimenti pilota eseguiti su vari muscoli hanno mostrato che la registrazione dal DAO è scarsamente contaminata da cross talk con i muscoli controlaterali, cosa che avviene maggiormente per il muscolo nasale ed orbicolare della bocca, non rendendo possibile una corretta misurazione ed interpretazione del MEP ipsi e controlaterale in questi muscoli. Per l'EMG di superficie del DAO, l'elettrodo registrante veniva posizionato tra angolo della bocca e bordo inferiore della mandibola, l'elettrodo di riferimento circa 1-2 cm inferiormente (Lapatki et al. 2003), l'elettrodo di terra sul mento. Per entrambi i muscoli DAO è stata registrata l'attività EMG rettificata e non rettificata. I segnali bioelettrici sono stati amplificati (x 1000) attraverso l'amplificatore Digitimer D360 (Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Herts, UK), filtrati (banda passante 3–3.000 Hz) e campionati a 5 kHz, utilizzando una scheda di conversione analogico digitale (1401 power, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) ed il software Signal 4 installato su un

computer. La finestra di analisi era di 250 ms (100 ms prima e 150 ms dopo lo stimolo magnetico).

2.3. Stimolazione magnetica transcranica.

La stimolazione magnetica transcranica è stata effettuata con un coil focale a farfalla utilizzando l'unità Bistim2 della Magstim (Magstim Co., Whitland, Dyfed, UK). Il punto ottimale (hot spot) per evocare un MEP nel muscolo DAO è stato attentamente cercato in ciascun soggetto e, una volta individuato, è stato marcato su una cuffia in cotone aderente alla testa per permettere un corretto e ripetibile riposizionamento del coil nei successivi esperimenti e per permettere la misurazione della distanza dell'hot spot dal vertice. Gli esperimenti sono stati eseguiti posizionando il coil sullo scalpo dell'emisfero sinistro o destro con il manico che puntava posteriormente e lateralmente, ruotato di circa 30° rispetto alla linea sagittale mediana. Questo orientamento induce sull'encefalo una corrente diretta in senso posteroanteriore, grossomodo perpendicolare alla presunta direzione del solco centrale; inoltre è noto essere l'orientamento ottimale per evocare risposte a media latenza di ampiezza maggiore nell'area motoria della faccia, che è stato dimostrato essere di origine corticale (Dubach et al., 2004). L'intensità di stimolazione è stata espressa come percentuale del massimo output dello stimolatore (%MSO). La soglia motoria a riposo (RMT) è stata considerata come la minima intensità in grado di evocare una risposta di circa 50 μ V in almeno 5 su 10 consecutivi stimoli nel muscolo DAO controlaterale a riposo. La soglia motoria attiva (AMT) è stata considerata pari alla minima intensità capace di indurre un MEP con ampiezza maggiore di 100 μ V in almeno 5 su 10 consecutivi stimoli nel DAO controlaterale attivo al 10% della MVC. La frequenza di stimolazione era di 0.25 Hz.

2.4. Procedure sperimentali

Esperimento 1 (TMS a singolo stimolo della corteccia motoria facciale sinistra).

Le caratteristiche (latenza di onset e latenza al picco) delle risposte motorie medie evocate dalla stimolazione magnetica della corteccia motoria sinistra sono state studiate in tutti i soggetti partecipanti allo studio. Allo scopo di dare un contributo alla materia ancora controversa dell'asimmetria delle proiezioni cortico-facciali ai muscoli inferiori della faccia, sono stati registrati 10 MEP consecutivi dal muscolo controlaterale (cDAO) ed ipsilaterale (iDAO) all'emisfero stimolato. L'intensità di stimolazione utilizzata era il 120% della RMT del DAO controlaterale nelle registrazioni a riposo e 120% dell'AMT nelle registrazioni in attivazione muscolare. L'ampiezza del MEP test, evocato nei soggetti da noi studiati, era più bassa rispetto a quella di 1 mV classicamente utilizzata nell'area motoria della mano (Kujirai et al. 1993), perché in alcuni soggetti non è stato possibile ottenere un MEP di ampiezza maggiore senza dover utilizzare alte intensità di stimolo che venivano riferite come fastidiose.

Esperimento 2 (TMS a doppio stimolo dell'emisfero sinistro a riposo: effetti dello stimolo condizionante sui MEP ipsi e controlaterali).

Quattordici soggetti hanno partecipato a questo esperimento. La SICI e la ICF sono state valutate utilizzando il classico paradigma del doppio stimolo descritto da Kujirai et al. (1993), che prevede la somministrazione di un primo stimolo condizionante (CS) sottosoglia, seguito da un secondo stimolo test (TS) soprasoglia. L'intensità del TS è stata settata al 120% e quella del CS al 70% della RMT. L'ampiezza del MEP test era più bassa rispetto a quella classicamente utilizzata in studi precedenti (Kujirai et al. 1993) per i motivi elencati nell'esperimento 1. Sono stati valutati gli

intervalli interstimolo di 2, 3 e 5 ms per la SICI e di 10 e 15 ms per la ICF. Sono stati registrati bilateralmente 60 MEP (10 MEP condizionati per ciascuno dei 5 ISI testati e 10 MEP non condizionati per il test). L'ampiezza media di ciascun MEP condizionato è stata espressa come rapporto tra MEP condizionato/MEP test.

Esperimento 3 (TMS a doppio stimolo dell'emisfero sinistro durante contrazione volontaria: effetti dell'intensità dello stimolo condizionante).

Tutti e 19 i soggetti hanno partecipato a questo esperimento. L'intensità del TS è stata settata al 120% della AMT. Sono state utilizzate due intensità di stimolo condizionante (70% e 80% della AMT). Gli intervalli interstimolo testati erano gli stessi dell'esperimento 2. Per ciascuna intensità di stimolo condizionante sono stati registrati 60 MEP (10 MEP condizionati per ciascuno dei 5 ISI testati e 10 MEP non condizionati per il test) durante contrazione volontaria tonica dei muscoli DAO, pari al 10% della MVC. L'ampiezza media di ciascun MEP condizionato è stata espressa come rapporto tra MEP condizionato/MEP test.

Esperimento 4 (TMS a singolo e doppio stimolo dell'emisfero destro).

Questo esperimento, condotto su 5 soggetti, aveva lo scopo di valutare se le caratteristiche (hot spot, latenza di onset e latenza al picco) delle risposte motorie medie evocate dalla stimolazione magnetica della corteccia motoria destra nei muscoli DAO, a riposo e attivati volontariamente, differivano dalle risposte ottenute con stimolazione della corteccia sinistra. I parametri utilizzati erano gli stessi dell'Esperimento 1. Nei 5 soggetti che hanno partecipato all'esperimento, la SICI e la ICF sono state valutate utilizzando il paradigma del doppio stimolo descritto negli esperimenti 2 e 3.

2.5. Analisi dei dati.

L'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS versione 18 (SPSS Inc, Chicago, Illinois USA) applicando l'analisi della varianza (ANOVA per misure ripetute) o il test t di Student. Nel caso di valori significativi della F , è stata applicata l'analisi post hoc utilizzando il test t di Student. È stato considerato significativo il valore della $p < 0.05$. Tutti i dati, se non diversamente specificato sono stati espressi come media \pm errore standard. Nell'esperimento 1 le caratteristiche e l'asimmetria delle proiezioni corticobulbari (cDAO *versus* iDAO) è stata valutata testando la differenza tra le latenze e le ampiezze medie dei cMEPs ed iMEPs applicando il test t di Student per dati appaiati.

Nell'esperimento 2, per valutare l'effetto dei diversi ISIs sul MEP è stata applicata l'ANOVA a due vie con muscolo (iDAO e cDAO) e ISI (2, 3, 5, 10, 15 ms) come "within subject factors".

Nell'esperimento 3, per le registrazioni del MEP durante contrazione muscolare è stata applicata un'ANOVA a due vie, separatamente per iDAO e cDAO, con intensità di CS e ISI come "within subject factors".

Nell'esperimento 4, le caratteristiche e l'asimmetria delle proiezioni corticobulbari (cDAO *versus* iDAO) sono state valutate testando la differenza tra le latenze e le ampiezze medie dei cMEPs ed iMEPs applicando il test t di Student per dati appaiati. È stato inoltre eseguito lo stesso test t di Student per dati appaiati per valutare possibili differenze dovute all'emisfero stimolato (sinistro *versus* destro) per hot spot, latenza all'onset, latenza al picco e ampiezza della risposta evocata dal TS MEP, sia per il cDAO che per il iDAO.

3. RISULTATI

La TMS della corteccia motoria facciale induceva nei muscoli depressori dell'angolo della bocca (DAO) una risposta motoria bilaterale e asimmetrica (figura 1). Durante contrazione muscolare, ad un livello pari al 10% MVC, è stato possibile evocare la risposta motoria nel DAO controlaterale di tutti i 19 soggetti testati (figura 1B). A causa dell'elevata RMT è stato invece possibile evocare il MEP a riposo nel muscolo DAO controlaterale (cDAO) in 14 dei 19 soggetti testati (figura 1A). Nella condizione di riposo è stato possibile ottenere un MEP nel muscolo iDAO in 12 soggetti, nella condizione di attività muscolare in 15 soggetti. L'intensità media di stimolazione della RMT era pari al $53.7 \pm 6.7\%$ dell'output motorio massimo dello stimolatore (MSO), mentre la AMT era pari al $47.9 \pm 7.1\%$ della MSO.

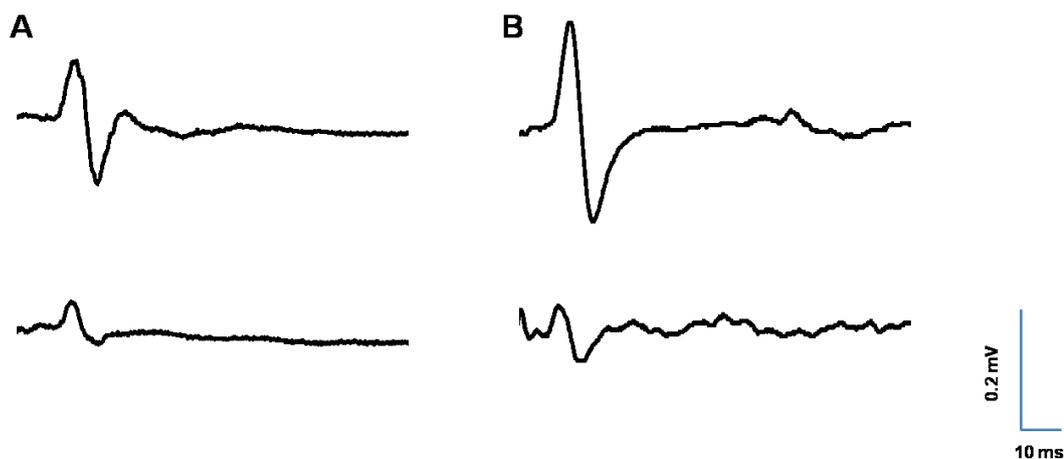


Figura 1

Nella figura sono illustrati i potenziali motori (MEP) evocati nel muscolo depressore dell'angolo della bocca (DAO) di un soggetto rappresentativo.

A: Media di 10 MEP evocati nel DAO controlaterale (traccia superiore) ed ipsilaterale (traccia inferiore) a riposo dalla stimolazione magnetica dell'area motoria facciale dell'emisfero sinistro.

B: Media di 10 MEP evocati nel DAO controlaterale (traccia superiore) ed ipsilaterale (traccia inferiore) durante contrazione muscolare volontaria, al 10% della MVC, per stimolazione della stessa area motoria.

Si può notare che la risposta è bilaterale e asimmetrica (controlaterale > ipsilaterale) in entrambe le condizioni.

3.1. Studio della SICI e ICF nella corteccia motoria facciale.

Esperimento 1 (TMS a singolo stimolo della corteccia motoria facciale sinistra).

L'hot spot del DAO sull'emisfero sinistro era localizzato, in media, 4.43 ± 1.55 cm anteriormente e 7.58 ± 1.58 cm lateralmente al vertice. La latenza all'onset del MEP test controlaterale a riposo era chiaramente misurabile in tutti i 14 soggetti (10.76 ± 0.07 ms), mentre quella del MEP test ipsilaterale (12.96 ± 0.13 ms) era misurabile solo in 12/14 soggetti, in quanto in due soggetti la risposta era coperta dall'artefatto dello stimolo o assente. I valori medi della latenza al picco erano 14.97 ± 0.09 ms per il cMEP (14 soggetti) e 15.63 ± 0.14 ms per il iMEP (12 soggetti). Il confronto tra le risposte ipsi- e controlaterali dei valori della latenza all'onset e della latenza al picco nei 12 soggetti, che presentavano la risposta bilateralmente, ha mostrato una differenza significativa per l'onset ($p=0.005$) ma non per la latenza al picco. Per quanto riguarda le risposte registrate durante contrazione volontaria al 10% della MVC, la latenza all'onset del MEP test controlaterale era misurabile in tutti i 19 soggetti (9.71 ± 0.06 ms), mentre quella del MEP test ipsilaterale (11.61 ± 0.12 ms) era misurabile solo in 15/19 soggetti, in quanto in due soggetti il MEP era parzialmente coperto dall'artefatto dello stimolo o dal potenziale di azione composto derivante dall'attivazione diretta della componente motoria della radice del nervo facciale ipsilaterale e in altri due soggetti la risposta ipsilaterale non era presente. In condizione di attivazione muscolare, valori medi della latenza al picco del cMEP erano 14.51 ± 0.07 ms (19 soggetti) e 15.25 ± 0.06 ms per il iMEP (15 soggetti). Il confronto ipsi/controlaterale dei valori della latenza all'onset e della latenza al picco dei MEP registrati in attivazione ($n=15$) ha mostrato una differenza significativa tra i valori dell'onset ($p=0.032$) ma non per la latenza al picco (figura 1).

L'intensità del 120% della RMT utilizzata come stimolo test (TS) ha evocato MEP di ampiezza mediapari a 0.21 ± 0.035 mV controlateralmente e di 0.073 ± 0.01 mV ipsilateralmente. Il TS utilizzato in condizione di attivazione muscolare (120% AMT) evocava risposte di ampiezza media pari a 0.35 ± 0.03 mV controlateralmente, e a 0.152 ± 0.03 mV ipsilateralmente. Il test t di Student per dati appaiati ha messo in evidenza una differenza significativa tra l'ampiezza del cMEP e dell' iMEP sia in condizioni di riposo ($p < 0.01$) che di attivazione muscolare ($p = 0.021$).

Esperimento 2 (TMS a doppio stimolo dell'emisfero sinistro a riposo).

Quando sulla corteccia motoria facciale veniva applicata la TMS a doppio stimolo, l'ampiezza del MEP condizionato a riposo era significativamente ridotta rispetto a quella del MEP test, agli intervalli interstimolo (ISI) di 2 e 3 ms ma non all'intervallo di 5ms. (figura 2). Al contrario, agli intervalli interstimolo di 10 e 15 ms, il MEP condizionato si presentava significativamente aumentato di ampiezza (figura 2). In particolare, i valori medi di ampiezza del cMEP ottenuti con lo stimolo condizionante al 70% RMT erano: 0.209 ± 0.02 mV per il MEP test e 0.114 ± 0.02 mV, 0.057 ± 0.01 mV, 0.320 ± 0.03 mV e 0.329 ± 0.03 mV per i MEP condizionati agli ISI, rispettivamente di 2, 3, 10 e 15 ms. Gli stessi valori per il iMEP erano rispettivamente 0.073 ± 0.01 mV, 0.056 ± 0.01 mV, 0.049 ± 0.01 mV, 0.10 ± 0.02 mV e 0.115 ± 0.02 mV.

SICI e ICF nella corteccia motoria facciale a riposo

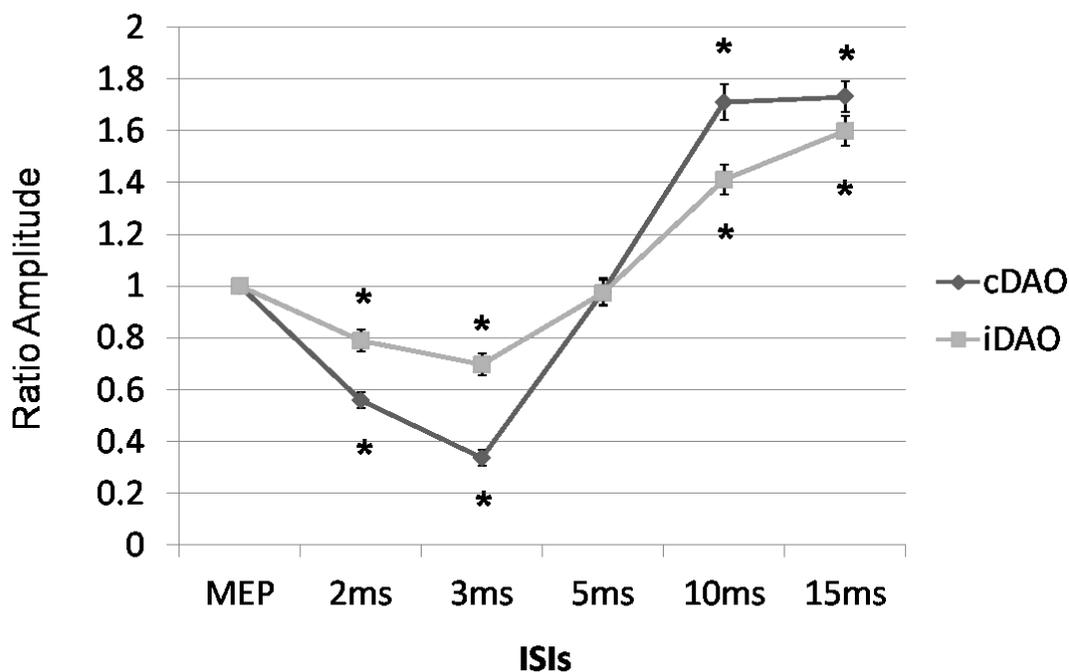


Figura 2

Nel grafico sono riportati gli effetti degli ISI nel protocollo a doppio stimolo sulle risposte motorie del muscolo depressore dell'angolo della bocca controlaterale (cDAO) ed ipsilaterale (iDAO) a riposo. Si può notare che gli intervalli interstimolo di 2 ms e 3 ms inducevano una riduzione significativa dell'ampiezza del MEP e che gli intervalli di 10 ms e 15 ms inducevano una facilitazione significativa del MEP, sia nel muscolo ipside controlaterale. Le ampiezze (Ratio Amplitude) sono state riportate come il rapporto tra MEP test e MEP condizionato. Asterischi: $p < 0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

L'ANOVA per misure ripetute applicata alla valutazione degli effetti degli ISI e del muscolo registrato (cDAO *versus* iDAO) sul MEP a riposo ("*within-subject factor*"; ISI*MUSCLE) ha messo in evidenza un significativo effetto degli ISI ($p < 0.001$) ed una significativa interazione tra ISI e muscolo (p

=0.009). L'analisi *post hoc* ha mostrato che la modulazione del MEP condizionato era significativa in tutti gli ISI testati eccetto l'intervallo di 5 ms, sia per il cMEP (2 ms e 3ms: $p < 0.001$; 10 ms: $p = 0.004$; 15 ms: $p = 0.001$), che per il iMEP (2 ms: $p = 0.009$; 3 ms: $p = 0.002$; 10 ms: $p = 0.02$; 15 ms: $p = 0.001$). Inoltre il t test ha rilevato una significativa differenza tra iMEP e cMEP per gli intervalli di 2 ms ($p=0.018$) e 3 ms ($p<0.001$), mentre per gli intervalli 10 e 15 ms non è stata evidenziata alcuna differenza tra i due lati di registrazione (figura 3).

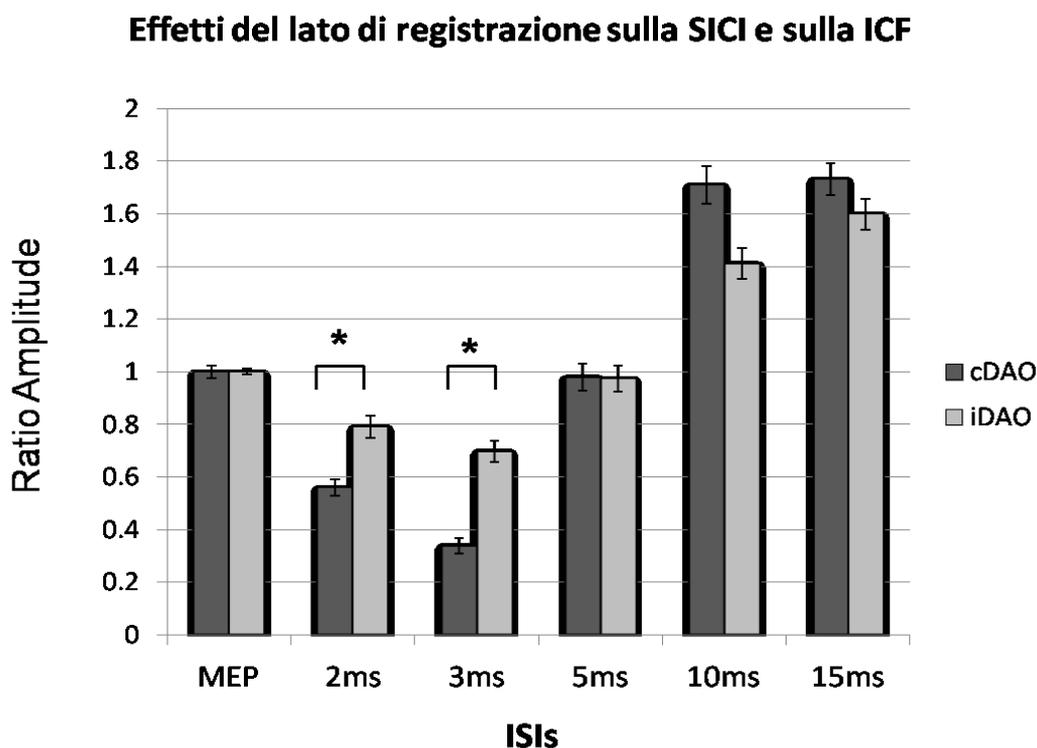


Figura 3

Nell'istogramma sono riportati gli effetti del protocollo a doppio stimolo sulla proiezione al DAO ipsi- e controlaterale della corteccia motoria facciale a riposo. È stata evidenziata una significativa riduzione della SICI per ISI di 2ms e 3 ms nel DAO ipsilaterale (iDAO) rispetto al controlaterale (cDAO). La ICF agli intervalli di 10 ms e 15 ms non differiva significativamente per i due muscoli. Le ampiezze (Ratio Amplitude) sono state riportate come il rapporto tra MEP test e MEP condizionato. Asterischi: $p < 0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

Esperimento 3 (TMS a doppio stimolo dell'emisfero sinistro durante contrazione volontaria: effetti dell'intensità dello stimolo condizionante).

I valori medi di ampiezza del cMEP ottenuti con lo stimolo condizionante al 70% AMT erano 0.334 ± 0.02 mV per il MEP test e 0.229 ± 0.02 mV, 0.215 ± 0.02 mV, 0.297 ± 0.02 mV, 0.413 ± 0.02 mV e 0.418 ± 0.03 mV per i MEP condizionati agli ISI di 2, 3, 5, 10 e 15 ms, rispettivamente. Gli stessi valori per il iMEP erano rispettivamente 0.186 ± 0.03 mV, 0.150 ± 0.03 mV, 0.151 ± 0.03 mV, 0.163 ± 0.03 mV, 0.199 ± 0.03 mV, e 0.190 ± 0.03 mV. I valori medi di ampiezza del cMEP ottenuti con lo stimolo condizionante di 80% della AMT erano 0.317 ± 0.02 mV per il MEP test e 0.243 ± 0.02 mV, 0.207 ± 0.02 mV, 0.251 ± 0.02 mV, 0.375 ± 0.02 mV e 0.420 ± 0.03 mV per i MEP condizionati agli ISI di 2, 3, 5, 10 e 15 ms, rispettivamente. Gli stessi valori per il iMEP erano rispettivamente 0.173 ± 0.03 mV, 0.161 ± 0.03 mV, 0.147 ± 0.03 mV, 0.152 ± 0.03 mV, 0.172 ± 0.03 mV, e 0.205 ± 0.03 mV.

L'ANOVA per misure ripetute applicata alla valutazione degli effetti degli ISI e del CS (70% *versus* 80%) sul MEP in attivazione (“*within-subject factor*”; ISI*CS) ha messo in evidenza un significativo effetto degli ISI ($p < 0.001$) ma nessuna significativa interazione tra ISI e CS, sia per iDAO che per cDAO. L'analisi *post hoc* ha mostrato che l'inibizione del cMEP condizionato era significativa in tutti gli ISI testati, eccetto l'intervallo di 5 ms, per il CS 70% (2 ms e 3ms: $p < 0.001$), mentre per il CS 80% era significativa in tutti gli intervalli inibitori testati (2 ms: $p = 0.013$; 3 ms: $p = 0.001$; 5 ms = 0.038). La facilitazione del cMEP era significativa per entrambi i CS a 10 ms (rispettivamente, $p = 0.016$ e $p = 0.035$) mentre per l'intervallo 15 ms, la facilitazione del cMEP era significativa ($p = 0.019$) quando il CS era pari all'80% mentre non raggiungeva significatività statistica ($p = 0.05$), con il CS 70% (figura 4 A). Per quanto riguarda l'iMEP, l'analisi *post hoc* ha mostrato che l'inibizione dell'iMEP condizionato

era significativa per gli ISI 2 e 3 ms (rispettivamente $p = 0.037$ e $p = 0.03$) con CS 70%. Con lo stesso stimolo condizionante non si è evidenziata alcuna facilitazione significativa del iMEP, agli intervalli 10 e 15 ms. Con CS 80% la riduzione del MEP era significativa agli all'intervallo di 3 ms ($p=0.048$), mentre la facilitazione era significativa all'ISI 15 ms ($p=0.035$) (figura 4 B).

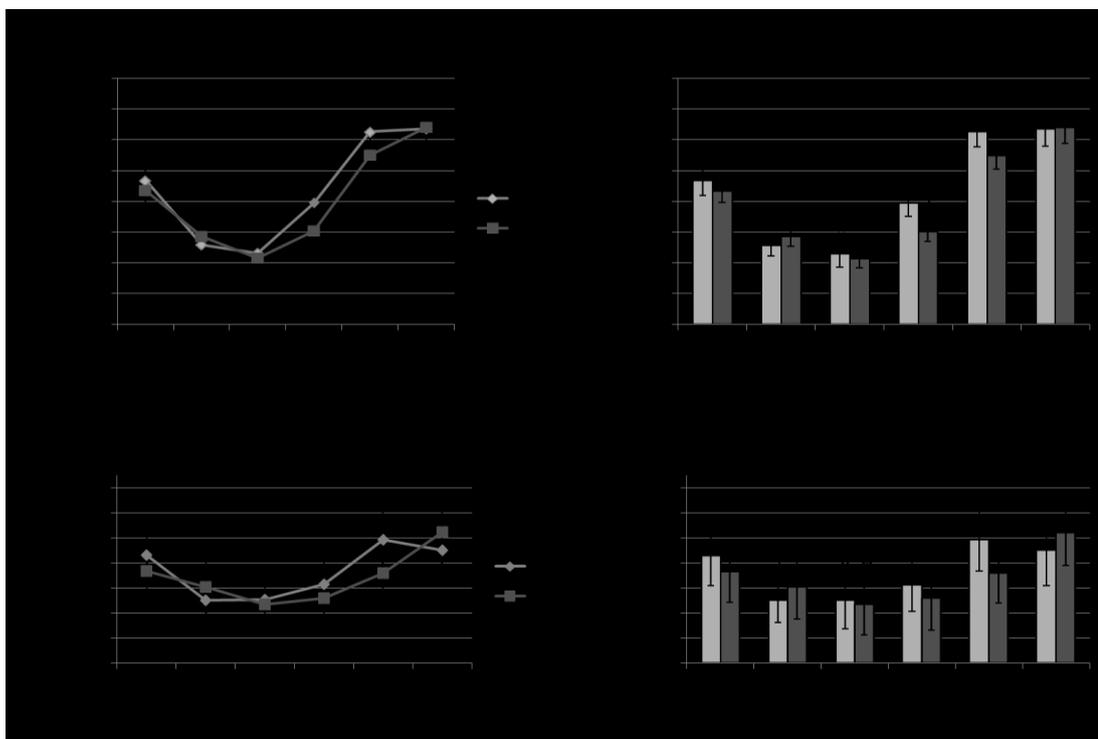


Figura 4

Nei grafici a sinistra sono riportati gli effetti dei diversi stimoli condizionanti sugli ISI nel protocollo a doppio stimolo durante contrazione muscolare. A: Effetti del CS 70% e CS 80% sul cDAO durante attivazione muscolare. L'analisi statistica ha evidenziato un significativo effetto degli ISI ($p < 0.001$) ma non ha evidenziato differenze significative di SICI e ICF utilizzando i due diversi CS. Nell'istogramma a destra è mostrata una significativa inibizione per gli intervalli di 2 e 3 ms ed una facilitazione a 10 ms, per entrambi i CS utilizzati. Il CS 80% della AMT inibiva significativamente anche a 5 ms e facilitava a 15 ms. B: Effetti del CS 70% e CS 80% sul iDAO durante attivazione muscolare. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative dei due CS utilizzati. È stata evidenziata una significativa inibizione dell'iMEP a 2 e 3 ms utilizzando il CS 70%, inibizione e facilitazione per gli ISI di 3ms e 15 ms, rispettivamente, utilizzando il CS 80%. Le ampiezze (Amplitude) sono state espresse in mV. Asterischi: $p < 0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

Esperimento 4 (TMS a singolo e doppio stimolo sull'emisfero destro).

TMS a singolo stimolo

Hanno partecipato a questo esperimento 5 soggetti, di cui solamente 4 avevano MEP valutabili a riposo. La localizzazione media dell'hot spot sull'emisfero destro era, rispetto al vertice, 3.3 ± 0.54 cm anteriore e 9.1 ± 0.4 cm laterale. Il test t di Student per dati appaiati, non ha evidenziato alcuna differenza significativa nella posizione dell'hot spot tra emisfero destro e sinistro. L'intensità media della RMT era $49.7 \pm 1.2\%$, mentre la AMT era $44.25 \pm 3.6\%$ della MSO. Il test t di Student per dati appaiati non ha evidenziato alcuna differenza significativa di RMT e AMT tra emisfero destro e sinistro.

La latenza all'onset del MEP test controlaterale a riposo era 12.51 ± 0.41 ms, quella del MEP test ipsilaterale era misurabile solo in 3 soggetti ed era 11.75 ± 0.38 ms. I valori medi della latenza al picco erano 16.56 ± 0.47 ms per il cMEP e 16.36 ± 0.51 ms per il iMEP. Il confronto dei valori della latenza all'onset e della latenza al picco nei 4 soggetti, in cui la risposta era presente bilateralmente, non ha mostrato alcuna differenza significativa tra iDAO e cDAO per entrambi i parametri..

Per quanto riguarda le risposte registrate, nei 5 soggetti, durante contrazione volontaria, la latenza all'onset del MEP test controlaterale era 9.66 ± 0.21 ms, mentre quella del MEP test ipsilaterale, misurabile in 4 soggetti, era 11.11 ± 0.19 ms. I valori medi della latenza al picco erano, nei 5 soggetti, 14.79 ± 0.21 ms per il cMEP e 14.49 ± 0.18 ms per il iMEP. Il confronto dei valori della latenza all'onset e della latenza al picco dei MEP registrati in attivazione, nei 4 soggetti in cui erano presenti risposte bilaterali, ha mostrato una differenza significativa per i valori dell'onset ($p=0.021$) ma non ha mostrato differenze significative di lato, per la latenza al picco.

L'intensità del 120% della RMT utilizzata come stimolo test (TS), in condizioni di riposo muscolare, ha evocato MEP di ampiezza media 0.216 ± 0.077 mV controlateralmente e 0.059 ± 0.04 mV ipsilateralmente. Il TS utilizzato per evocare i MEP in attivazione (120% AMT) evocava risposte nel cDAO di 0.464 ± 0.08 mV di ampiezza, nell'iDAO 0.21 ± 0.08 mV. Il test t di Student per dati appaiati non ha messo in evidenza una differenza significativa tra cMEP e iMEP a riposo ($p = 0.066$) mentre durante attivazione muscolare la differenza tra cMEP ed iMEP era significativa ($p = 0.01$). Analogamente, non è stata evidenziata alcuna differenza significativa, dovuta all'emisfero stimolato (sinistro *versus* destro) né sulla latenza di onset, né sulla latenza al picco e neppure sull'ampiezza del MEP test ispi e controlaterale, registrato sia nella condizione di riposo che di attivazione muscolare

TMS a doppio stimolo

Quando sulla corteccia motoria facciale destra veniva applicata la TMS a doppio stimolo, l'ANOVA per misure ripetute applicata alla valutazione degli effetti degli ISI sul cMEP a riposo ($n=4$), ha messo in evidenza un significativo effetto degli ISI ($p = 0.003$). L'analisi *post hoc* ha mostrato che l'inibizione del MEP condizionato era significativa solo per l'intervallo di 2 ms ($p = 0.036$). Non è stata evidenziata nessuna facilitazione del cMEP a riposo per nessuno degli intervalli facilitatori testati, solamente un trend ($p=0.075$) per l'ISI 15 ms (figura 5). L'analisi della varianza per il iMEP in tre soggetti, ha dato una debole significatività di effetto degli ISIs ($p = 0.049$) ed il *post hoc* non ha evidenziato nessuna differenza significativa tra MEP test e MEP condizionato, per nessuno degli intervalli testati (figura 5).

Effetti della TMS sul DAO a riposo applicato all'emisfero destro

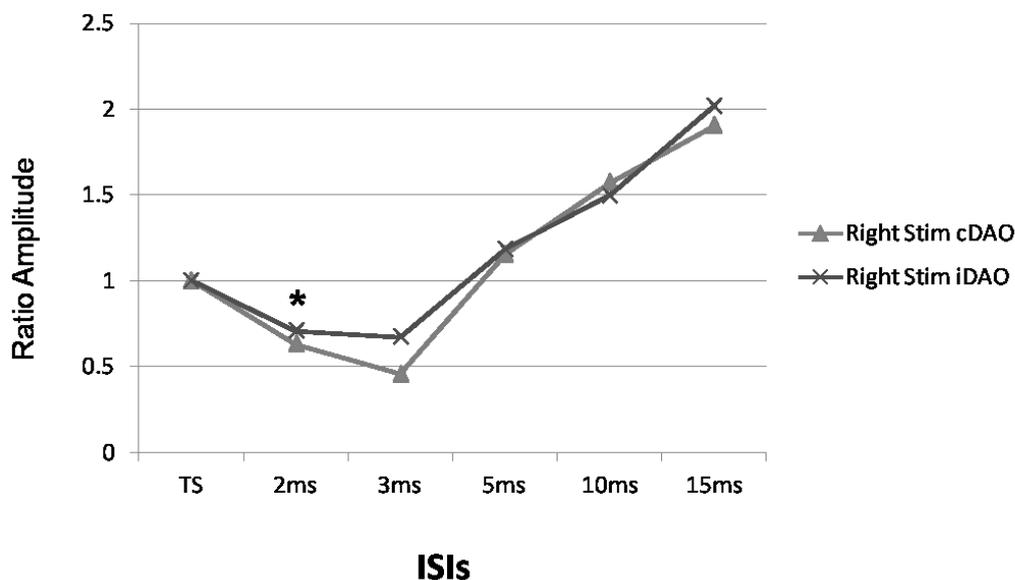


Figura 5

Nel grafico sono riportati gli effetti degli ISI nel protocollo a doppio stimolo applicato alla corteccia motoria destra, sulle risposte motorie del muscolo depressore dell'angolo della bocca controlaterale (cDAO) ed ipsilaterale (iDAO) a riposo. Si può notare che solo l'intervallo interstimolo di 2ms induce una riduzione significativa dell'ampiezza del MEP controlaterale, nonostante l'ANOVA fosse significativa per l'effetto degli ISI ($p=0.003$). Le ampiezze (Ratio Amplitude) sono state riportate come il rapporto tra MEP test e MEP condizionato. Asterischi: $p<0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

L'ANOVA per misure ripetute applicata alla valutazione degli effetti degli ISI e del CS (70% *versus* 80%) sul cDAO in attivazione ($n=4$) ("within-subject factor"; ISI*CS) ha messo in evidenza un significativo effetto degli ISI ($p = 0.003$) ma nessuna significativa interazione tra ISI e CS. L'analisi *post hoc* ha mostrato che l'inibizione del cMEP condizionato con CS 70% era significativa in tutti gli ISI testati eccetto l'intervallo di 5 ms, (2 ms e 3 ms: $p = 0.003$ e $p = 0.006$), ma non è stata evidenziata alcuna facilitazione per gli intervalli di 10 e 15 ms. Il CS 80% non ha mostrato alcuna significatività per tutti gli intervalli testati (figura 6).

Effetti dei diversi CS sul cDAO attivo per TMS dell'emisfero destro

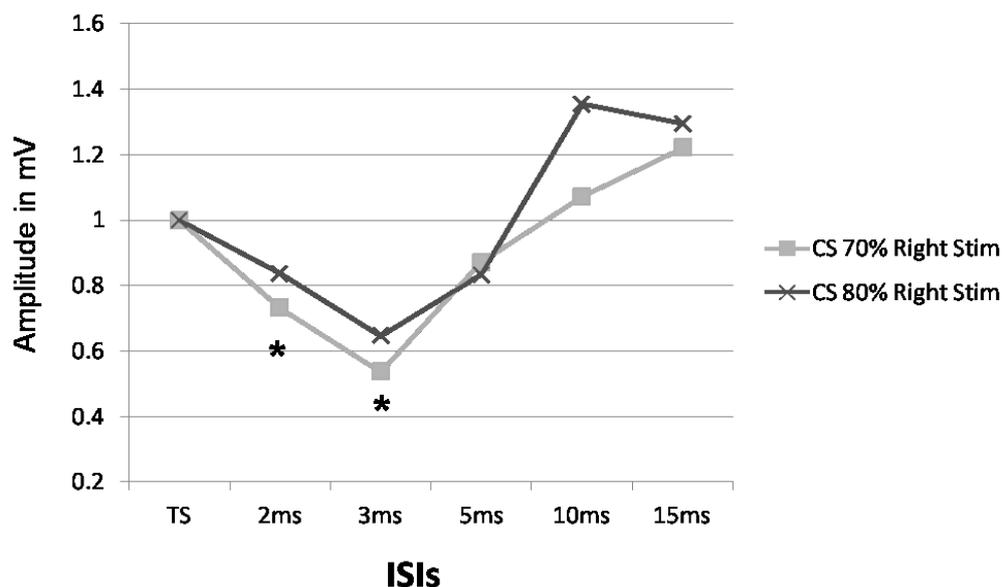


Figura 6

Nel grafico sono riportati gli effetti dei diversi stimoli condizionanti sugli ISI nel protocollo a doppio stimolo durante contrazione muscolare per stimolazione della corteccia motoria facciale destra. L'ANOVA con ISI come “*within subject factor*” era significativa ($p=0.003$) per CS 70% e CS 80% sul cDAO. L'analisi *post hoc* ha evidenziato significativa inibizione dell'iMEP a 2 e 3 ms utilizzando il CS 70%, ma nessun intervallo significativo utilizzando il CS 80%. Le ampiezze (Amplitude) sono state espresse in mV. Asterischi: $p<0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

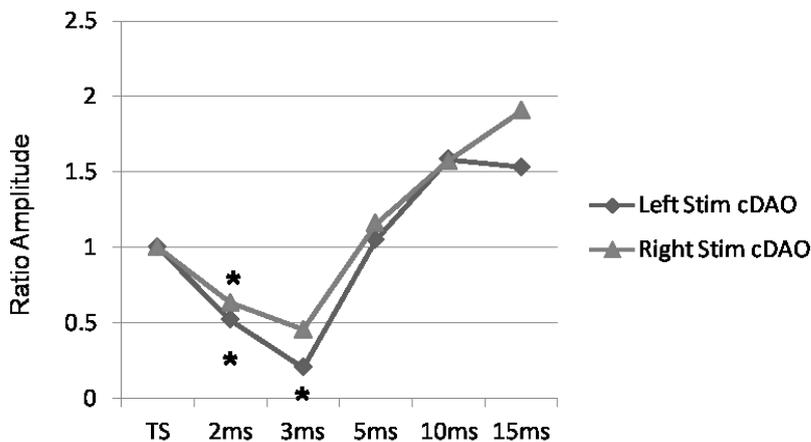
Per quanto riguarda l'iMEP, l'esiguità del campione ($n=2$) non ha permesso la corretta esecuzione dell'analisi statistica.

Per valutare l'effetto dell'emisfero stimolato e degli ISI sul cMEP a riposo, è stata eseguita l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute su 4 soggetti, utilizzando l'emisfero (destro e sinistro) e gli ISI (2, 3, 5, 10 e 15 ms) come “*within subject factors*”. L'ANOVA ha mostrato un effetto significativo dell'ISI ($p=0.016$), ma nessuna interazione tra emisfero stimolato e ISI. Il *post hoc* ha evidenziato un'inibizione significativa per l'intervallo di 2 ms per emisfero sinistro e destro ($p = 0.008$ e $p = 0.036$,

rispettivamente) e solo per l'emisfero sinistro a 3 ms ($p = 0.001$). Nel campione testato ($n = 4$) non è stata evidenziata alcuna facilitazione significativa, ma solo un trend per l'intervallo di 15 ms ($p = 0.068$) (figura 7A).

Per valutare l'effetto dell'emisfero stimolato e degli ISI sul cMEP registrato in condizioni di attivazione muscolare (10% della MVC), è stata eseguita l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute su 4 soggetti, utilizzando emisfero (destra e sinistra) e ISI (2, 3, 5, 10 e 15 ms) come “*within subject factors*”. L'ANOVA ha mostrato un effetto significativo dell'ISI ($p < 0.001$) ma nessuna interazione tra emisfero stimolato e ISI. Il *post hoc* ha evidenziato un'inibizione significativa per gli intervalli di 2 ms e 3 ms per l'emisfero destro ($p = 0.003$ e $p = 0.006$, rispettivamente) mentre per l'emisfero sinistro non è stata evidenziata alcuna inibizione significativa (figura 7B). Per nessun emisfero è stata evidenziata facilitazione del MEP, durante la condizione di attività muscolare.

A: Effetti della TMS a doppio stimolo sul cDAO a riposo per stimolazione sinistra e destra



B: Effetti del CS sul cDAO attivo per stimolazione sinistra e destra

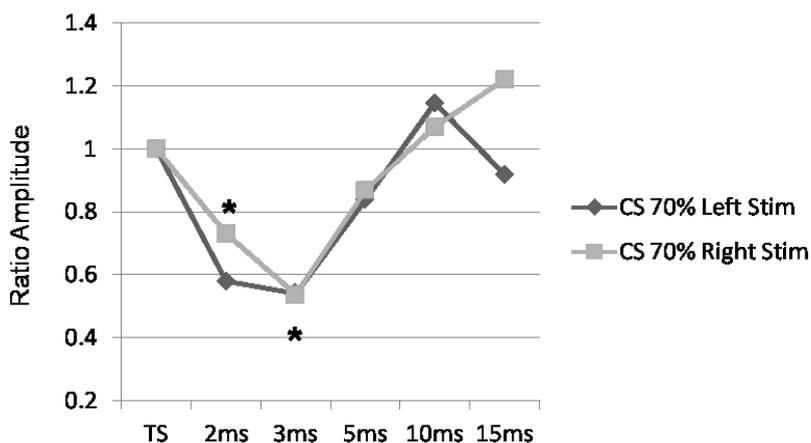


Figura 7

Nel grafico sono riportati gli effetti sui diversi emisferi degli ISI, a riposo e durante contrazione volontaria. A: Effetti della stimolazione destra e sinistra sul cMEP nella condizione di riposo. B: Effetti della stimolazione destra e sinistra sul cMEP nella condizione attività muscolare. L'ANOVA con ISI come within subject factor era significativa a riposo e durante attivazione muscolare ($p=0.016$ e $p<0.001$ rispettivamente). Non è stata evidenziata alcuna interazione tra stimolazione dell'emisfero destro e sinistro. L'analisi post hoc ha evidenziato significativa inibizione dell'iMEP a 2 e 3 ms per stimolazione sinistra e a 3 ms per stimolazione destra a riposo; durante attivazione muscolare erano significativamente inibiti l'intervallo di 2 ms per stimolo sinistro e 3 ms per stimolo destro. Le ampiezze (Amplitude) sono state espresse in mV. Asterischi: $p<0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

4. DISCUSSIONE

Il nostro studio ha dimostrato che nella rappresentazione corticale del muscolo depressore dell'angolo della bocca (DAO) sono attivi i circuiti inibitori che sottendono l'inibizione intracorticale a breve latenza e i circuiti eccitatori che sottendono la facilitazione intracorticale (. Inoltre questi dati confermano che le proiezioni cortico-facciali che controllano la muscolatura inferiore della faccia sono bilaterali e asimmetriche, con preponderanza di quelle controlaterali.

Proprietà funzionali della corteccia motoria facciale.

Diversi studi di TMS hanno valutato le proprietà della corteccia motoria facciale registrando i potenziali motori evocati nei muscoli orbicolare dell'occhio (Benecke et al., 1988; Cruccu et al., 1997; Kobayashi et al., 2001; Sohn et al., 2004; Paradiso 2005), nasale (Rösler et al., 1989; Dubach et al., 2004), orbicolare della bocca (Rösler et al., 1989; Cruccu et al., 1997; Liscic et al., 1998; Triggs et al., 2005; Sohn et al., 2004; Yildiz et al., 2004, 2007), mentale (Werhahn et al., 1995; Kobayashi et al., 2001) e depressore dell'angolo della bocca (Rödel et al., 2000; Paradiso 2005). Le registrazioni dai muscoli facciali si sono dimostrate estremamente difficili perché, oltre ai classici problemi tecnici riscontrabili in tutte le registrazioni effettuate nei muscoli cranici (artefatti da stimolo, risposte crociate da muscoli vicini etc.), questi muscoli hanno come caratteristica peculiare l'alta soglia di eccitabilità dei MEP quando il muscolo è rilassato, ed è spesso impossibile registrare il MEP a riposo (Cruccu et al., 1997).

Studi anatomici hanno suggerito che nell'uomo le proiezioni corticobulbari dirette ai nuclei motori che innervano la muscolatura inferiore della faccia sono prettamente controlaterali (Brodal, 1981; Rinn, 1984; Morecraft et al.,

2004). I dati fisiologici ottenuti da studi di TMS mostrano invece risultati contrastanti. Alcuni di questi studi, non avendo rilevato la presenza dei MEP ipsilaterali, o una scarsa ampiezza degli stessi, hanno confermato i dati anatomici (Benecke et al., 1988; Cruccu et al., 1997; Kobayashi et al., 2001). Studi con registrazione ad ago hanno invece riportato la presenza di MEP ipsilaterali nei muscoli inferiori della faccia (Benecke et al. 1988; Werhahn et al. 1995; Rödel et al. 1999). Altri studi hanno invece mostrato una chiara asimmetria di tali proiezioni, in quanto le latenze del MEP ipsilaterale e controlaterale differivano significativamente (Triggs et al., 2005; Paradiso et al., 2005).

Il nostro studio conferma la bilateralità ed asimmetria delle proiezioni corticobulbari ai muscoli inferiori del viso, nello specifico al muscolo DAO, con netta prevalenza di quella controlaterale. Possiamo escludere che tale asimmetria sia dovuta ad una contemporanea attivazione di entrambi gli emisferi, per diffusione dello stimolo magnetico in quanto l'utilizzo di un coil focale, come dimostrato da Rosler et al. (1989), induce un campo magnetico estremamente localizzato che non è capace di diffondersi da un emisfero all'altro. Nel nostro studio il MEP ipsilaterale aveva un'ampiezza media significativamente inferiore rispetto al MEP controlaterale, sia nelle registrazioni fatte a riposo (iMEP 0.073 ± 0.01 mV; cMEP 0.21 ± 0.035 mV) che durante contrazione volontaria (iMEP 0.152 ± 0.03 mV; cMEP 0.35 ± 0.03 mV). Inoltre la latenza all'onset del MEP ipsilaterale era significativamente maggiore rispetto al MEP controlaterale sia a riposo (12.96 ± 0.13 ms e 10.76 ± 0.07 ms, rispettivamente) che durante attivazione muscolare (11.61 ± 0.12 ms e 9.71 ± 0.06 ms, rispettivamente). Questo risultato conferma quanto osservato da Triggs et al. (2005) e suggerisce che le due risposte siano potenziali distinti piuttosto che risposte da volume condotto dal muscolo controlaterale (Paradiso et al., 2005).

Inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e facilitazione intracorticale (ICF).

Il nostro studio ha dimostrato che applicando il paradigma di Kujirai et al. (1993) è possibile studiare l'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF) anche nella corteccia motoria della muscolatura inferiore del viso, sia a riposo che in condizione di attivazione muscolare. La presenza della SICI e della ICF nel muscolo DAO a riposo conferma i dati di Paradiso et al. (2005). Il fatto che la SICI presenti caratteristiche identiche nel muscolo DAO controlaterale e ipsilaterale indica che probabilmente lo stesso gruppo di interneuroni corticali inibitori controlla sia la proiezione corticobulbare controlaterale che quella ipsilaterale. Questi dati sono in accordo con quanto descritto per altri muscoli che presentano un'innervazione bilaterale come i muscoli della lingua (Muellbacher et al. 2001) e i muscoli masticatori (Ortu et al. 2008). Tuttavia l'analisi statistica ha evidenziato un'interazione significativa tra l'entità della SICI nel DAO ipsi- e controlaterale, risultando significativamente ridotta nel muscolo ispsilaterale. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'entità del fenomeno SICI è dipendente dall'ampiezza del MEP test (Sanger et al. 2001; Roshan et al. 2003), che nel caso del iDAO risulta significativamente più piccolo rispetto al cDAO.

Per quanto riguarda lo studio dell'eccitabilità intracorticale durante attivazione muscolare, è stato possibile testare la SICI sia nel muscolo controlaterale che ipsilaterale, in accordo con i dati riportati dallo studio di Paradiso et al. (2005). Tuttavia, contrariamente a questo studio, i nostri dati hanno evidenziato una significativa facilitazione del cMEP, anche nella condizione di attivazione muscolare. Questo fatto potrebbe essere spiegato dalle diverse intensità di stimolo condizionante utilizzate nei due studi (70%

e 80% della AMT nel presente studio contro il 95% della AMT nello studio di Paradiso et al. (2005). Per quanto riguarda la ICF nel DAO attivo ipsilaterale, abbiamo osservato che il CS 70% della AMT non ha evocato alcuna facilitazione significativa dell'iMEP, mentre il CS 80% della AMT facilitava significativamente l'iMEP all'intervallo di 15 ms. Questo risultato è in accordo con quanto già mostrato nei muscoli della lingua, dove è stato evidenziato che alti CS riducono l'inibizione ma aumentano la facilitazione delle risposte motorie (Muellbacher et al., 2001).

TMS a singolo e doppio stimolo sull'emisfero destro.

Ci sono pochi studi di TMS che hanno valutato una possibile dominanza emisferica nel controllo motorio facciale (Triggs et al., 2005). Nel nostro studio sia la distanza dell'hot spot dal vertice che la RMT e l'AMT relativi all'emisfero destro, non differivano significativamente, rispetto ai dati raccolti per stimolazione dell'emisfero sinistro. Analogamente, le caratteristiche dei MEP evocati dalla stimolazione dell'emisfero destro non mostravano alcuna differenza significativa rispetto ai MEP ottenuti per stimolazione dell'emisfero sinistro, né in condizione di riposo né durante contrazione muscolare.

Il confronto dei valori della latenza all'onset e della latenza al picco non ha mostrato alcuna differenza significativa tra iDAO (11.75 ± 0.38 ms e 16.36 ± 0.51 ms, rispettivamente) e cDAO (12.51 ± 0.41 ms e 16.56 ± 0.47 ms, rispettivamente) a riposo. Questo potrebbe essere dovuto allo scarso numero di soggetti testato ($n=4$). Per quanto riguarda le risposte registrate durante contrazione volontaria, la latenza all'onset del cMEP (9.66 ± 0.21 ms) differiva significativamente dalla latenza all'onset dell'iMEP (11.11 ± 0.19 ms) ($n=4$). Lo stimolo test evocava risposte significativamente maggiori nel cDAO rispetto all'iDAO nella condizione di attivazione

muscolare, analogamente a quanto accadeva per stimolazione dell'emisfero sinistro. Al contrario, non vi era una differenza significativa di ampiezza ($p=0.066$) tra cMEP ed iMEP nella condizione di riposo, probabilmente sempre dovuta alla scarsa dimensione del campione ($n=3$). Lo studio dell'eccitabilità corticale applicando il paradigma del doppio stimolo all'emisfero destro ha messo in evidenza l'effetto dello stimolo condizionante sul MEP. La SICI appariva operante nei circuiti intracorticali dell'emisfero destro sia nella condizione di riposo che durante attivazione muscolare. Lo studio degli intervalli facilitatori a riposo non ha evidenziato alcuna facilitazione del MEP ma solamente un trend ($p=0.075$). Non è stata inoltre riportata alcuna facilitazione del MEP nella condizione di attività muscolare.

I nostri dati non sono sufficienti a desumere che la ICF non opera nella corteccia motoria facciale di destra, ma data la piccola dimensione del campione testato, sono da considerarsi non conclusivi. Si rendono pertanto necessari ulteriori studi su un campione più ampio, nel quale andrebbe anche testato l'effetto di intensità di CS maggiori, per provare l'assenza dei circuiti facilitatori intracorticali in questo emisfero. Sempre l'esigua dimensione del campione non ha permesso di eseguire la comparazione tra iDAO e cDAO per stimolazione dell'emisfero destro. La valutazione dell'effetto dell'emisfero stimolato sull'eccitabilità intracorticale, fatta comparando la SICI e la ICF ottenute sul cDAO a riposo per stimolazione destra e sinistra, non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra emisfero stimolato ed effetto degli ISI sull'ampiezza del MEP. Come detto sopra, il campione limitato a pochi soggetti, non ci permette, al momento, di affermare con certezza che i circuiti SICI ed ICF operano allo stesso modo nell'emisfero destro e sinistro.

In conclusione, sono necessari ulteriori studi per comprendere se la SICI e la ICF operano nella corteccia motoria destra della muscolatura inferiore della faccia durante attivazione volontaria e per chiarire la natura del potenziale registrato dal muscolo ipsilaterale.

STUDIO 2

Integrazione sensori-motoria e plasticità sinaptica nella corteccia motoria facciale

1. OBIETTIVI

È ben noto che la corteccia motoria dei mammiferi è plastica e capace di riorganizzarsi in risposta a fattori lesivi, cambiamenti ambientali, acquisizione di abilità o dopo ripetizione di semplici movimenti (Traversa et al., 1997; Butefisch et al., 2000; Muellbacher et al., 2001b). Il potenziamento e la depressione a lungo termine (LTP e LDT, rispettivamente) sono i meccanismi cellulari ritenuti responsabili della plasticità corticale indotta dall'apprendimento motorio (Cooke e Bliss, 2006; Stefan et al., 2000, 2002; Wolters et al., 200; Ziemann et al., 2004). Si pensa che un ruolo fondamentale nella modulazione dell'efferenza motoria corticale sia giocato dagli input afferenti (Asanuma e Pavlides, 1997; Chen et al., 1999; Tokimura et al., 2000; Sailer et al., 2002). L'integrazione del feedback sensitivo afferente nella generazione dei comandi motori della corteccia motoria primaria è molto importante, come si può concludere osservando la grave compromissione del cammino e dei movimenti fini riscontrata in pazienti con neuropatie sensitive a grosse fibre (Rothwell et al., 1982; Sanes et al., 1985; Lajoie et al., 1996) e le alterazioni dei movimenti fini manuali e dell'apprendimento motorio, in pazienti con disturbi del movimento (Maertens de Noordhout et al., 1992). Come detto in precedenza, i fenomeni dell'integrazione sensori-motoria e della plasticità corticale

nell'uomo, sono stati studiati in maniera estensiva nella corteccia motoria degli arti superiori e inferiori, soprattutto a livello della muscolatura della mano. Il distretto motorio facciale presenta varie peculiarità morfofunzionali rispetto ai distretti degli arti superiori ed inferiori. A differenza del distretto della mano in cui sono presenti nervi misti nei quali viaggiano sia le afferenze sensitive che le efferenze motorie, l'innervazione motoria dei muscoli facciali è di pertinenza del nervo facciale mentre quella sensitiva è mediata dal nervo trigemino. I muscoli facciali possiedono pochi o nessun fuso neuromuscolare (Voss, 1956; Lovell et al., 1977), non agiscono su articolazioni e sono privi di recettori profondi, come gli organi tendinei o i recettori articolari, e di fibre nervose afferenti muscolari (Connor and Abbs, 1998; Cruccu et al., 1997; Lin and Sessle, 1995; Nordin and Hagdarth, 1986, 1989; Popelle, 1993; Trulsson and Johansson, 2002; Yildiz et al., 2007).

Nel presente lavoro, per la prima volta è stato effettuato lo studio dell'integrazione sensori-motoria e della modulazione della plasticità corticale nella corteccia motoria facciale.

Gli obiettivi principali dello STUDIO 2 erano: (a) valutare gli effetti della stimolazione di un nervo periferico utilizzando il protocollo SAI; (b) valutare la plasticità della muscolatura inferiore della faccia applicando il protocollo di stimolazione associativa PAS; (c) individuare il corretto intervallo interstimolo ISI per evocare la LTP nella corteccia motoria facciale.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Soggetti

Quindici soggetti sani (6 maschi e 9 femmine) con età media di 33.7 ± 8 anni, tutti destrimani, hanno partecipato a questo studio, dopo aver dato per iscritto il loro consenso informato. Il protocollo sperimentale, approvato dal comitato etico locale, era in accordo con i principi etici stabiliti dalla dichiarazione di Helsinki. Più di un soggetto ha preso parte a più di un esperimento. Nessuno dei soggetti aveva storia di malattie neurologiche. Durante gli esperimenti nessun soggetto ha manifestato effetti collaterali. I soggetti erano seduti su una sedia confortevole con supporto per il collo e la testa, e veniva loro chiesto di stare rilassati ma concentrati durante tutto l'esperimento.

2.2. Registrazione dell'attività EMG

I potenziali motori (MEP) evocati dalla TMS della corteccia facciale sinistra sono stati registrati dal muscolo DAO destro, come esposto nel paragrafo 2.2 dello Studio 1. Nell'esperimento 4 è stata registrata l'attività EMG dal muscolo APB di destra, attraverso elettrodi di superficie standard (Ag-AgCl) posizionati sul ventre muscolare (elettrodo registrante), sull'articolazione metacarpofalangea del primo dito (elettrodo di riferimento) e sull'avambraccio (elettrodo di terra). Ai partecipanti, veniva chiesto, a seconda dell'esperimento, di mantenere il muscolo DAO completamente rilassato o di effettuare una contrazione isometrica ad un livello prestabilito (10% della massima contrazione volontaria, MVC) da mantenere costante nel corso della registrazione. In questo compito erano aiutati da un feedback visivo dell'attività EMG, filtrata e rettificata e da un feedback acustico. È stata registrata l'attività EMG rettificata e non rettificata sia nel muscolo a riposo che durante contrazione muscolare. I

segnali bioelettrici sono stati amplificati ($\times 1.000$) attraverso l'amplificatore Digitimer D360 (Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Herts, UK), filtrati (banda passante 3–3.000 Hz) e campionati a 5 kHz, utilizzando una scheda di conversione analogico digitale (power 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) ed il software Signal 4 installato su un computer. La finestra di analisi era di 200 ms (100 ms prima e 150 ms dopo lo stimolo magnetico).

2.3. Stimolazione magnetica transcranica

La stimolazione magnetica transcranica è stata effettuata utilizzando un coil focale a farfalla connesso all'unità Magstim 200 (Magstim Co., Whitland, Dyfed, UK). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti posizionando il coil sullo scalpo dell'emisfero sinistro con il manico che puntava indietro e lateralmente (ruotato di circa 30° rispetto alla linea sagittale mediana), approssimativamente perpendicolare al presunto orientamento del solco centrale. Il punto ottimale (hot spot) per evocare un MEP nel muscolo DAO è stato attentamente cercato in ciascun soggetto e, una volta individuato, è stato marcato su una cuffia in cotone aderente alla testa per permettere un corretto e ripetibile riposizionamento del coil nei successivi esperimenti (vedi studio 1 paragrafo 2.3). Nell'esperimento 4 il punto ottimale, per evocare il MEP soglia nel muscolo APB, è stato attentamente cercato in ciascun soggetto e, anche questo, marcato sulla cuffia di cotone al fine di permettere un corretto e ripetibile riposizionamento del coil nei successivi esperimenti. L'intensità di stimolazione è stata espressa come percentuale del massimo output dello stimolatore (% MSO). La soglia motoria a riposo (RMT) e la soglia motoria attiva (AMT) sono state definite per DAO e APB come nel paragrafo 2.3 dello Studio 1, secondo le linee guida IFCN (Rossini et al. 1994; Rothwell et al. 1999). Tutti gli stimoli

successivi sono stati erogati ad un'intensità pari al 110% della RMT, poiché, nei soggetti in cui la RMT era elevata, risultava difficile eseguire una stimolazione prolungata. La frequenza di stimolazione era di 0.25 Hz.

2.4. Stimolazione elettrica periferica

La stimolazione elettrica (ES) è stata applicata attraverso una coppia di elettrodi di superficie standard (Ag–AgCl) posizionando il catodo distalmente. Negli esperimenti 1-3 è stata stimolata la branca mandibolare del nervo facciale di destra; nell'esperimento 1 e 2 è stata stimolato anche il nervo mentale destro all'uscita dall'omonimo forame; nell'esperimento 4 è stato stimolato il nervo mediano al polso. Gli elettrodi stimolanti erano connessi ad uno stimolatore a corrente continua (modello DS7; Digitimer, Welwyn-Garden City, Herts, UK) che erogava singole onde quadre (200 μ s di durata) ad una frequenza di 0.25 Hz. Lo stimolo elettrico (ES) erogato era di intensità sufficiente ad evocare una risposta motoria periferica nei muscoli DAO e APB negli esperimenti 1-4 (Tokimura et al., 2000). Tale intensità di stimolazione viene definita soglia motoria elettrica (EMT), mentre negli esperimenti 1 e 2, in cui si stimolava il nervo mentale, lo stimolo era pari a due-tre volte la soglia percettiva.

2.5. Procedura sperimentale

Esperimento 1 (Effetti della stimolazione di un nervo periferico sulla risposta evocata dalla TMS della corteccia motoria facciale).

Questo esperimento è stato condotto su 13 dei soggetti arruolati nello studio. È stato applicato il classico paradigma SAI (Tokimura et al., 2000) che prevede la somministrazione di un primo stimolo elettrico (ES) seguito da un secondo stimolo test (TS) magnetico. L'intensità del TS e dell'ES

erano settate secondo le caratteristiche descritte sopra (paragrafi 2.3 e 2.4). Gli effetti indotti dall'utilizzo del paradigma SAI sono stati misurati nel muscolo DAO sia a riposo che durante attivazione muscolare al 10% della MVC, accoppiando la stimolazione della branca mandibolare del nervo facciale destro e la corteccia motoria facciale controlaterale. Per il protocollo SAI nel distretto motorio della mano sono utilizzati intervalli interstimolo basati sulla latenza della componente N20 del potenziale evocato sensitivo (SEP) del mediano. Non essendoci tali valori di riferimento per il sistema facciale, sono stati valutati gli intervalli interstimolo di 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ms. Quattro soggetti sono stati studiati due volte in giorni diversi, testando l'effetto della stimolazione del nervo facciale e del nervo mentale, rispettivamente, sul muscolo DAO a riposo. Intensità dello stimolo magnetico ed ISI erano gli stessi descritti sopra. L'intensità dell'ES era circa tre volte superiore alla soglia percettiva del soggetto (vedi metodi). Sono stati registrati dal DAO controlaterale 70 MEP (10 MEP condizionati per ciascuno dei 6 ISI testati e 10 MEP non condizionati per il test), sia per la condizione di riposo che per quella durante attivazione muscolare. L'ampiezza media di ciascun MEP condizionato è stata espressa come rapporto tra MEP condizionato/MEP test.

Esperimento 2 (effetti del protocollo PAS utilizzando 20 ms di ISI sui muscoli facciali a riposo e durante attivazione (PAS₂₀)).

L'esperimento 2, aveva lo scopo di valutare gli effetti della stimolazione associativa sul MEP dei muscoli facciali, sia in condizione di riposo che durante contrazione muscolare. In 15 soggetti, è stato somministrato il protocollo PAS accoppiando la ES del nervo facciale con la TMS della

corteccia motoria facciale controlaterale. Sono stati condotti esperimenti pilota su 3 soggetti utilizzando la ES della branca mentale del nervo trigemino per scegliere quale nervo periferico stimolare (PAS_{tri}). Come intervallo tra i due stimoli, elettrico e magnetico, è stato usato un ISI di 20 ms. Questo intervallo è stato scelto poiché corrisponde all'incirca alla latenza al picco del MEP più 5 ms, in accordo con il criterio utilizzato da Prior e Stinear (2006) per i muscoli degli arti inferiori. Il protocollo consisteva di 200 coppie di stimoli ad una frequenza di 0.25 Hz (Ziemann et al., 2004). Durante la stimolazione veniva chiesto al soggetto di mantenere la muscolatura facciale rilassata, di contare gli stimoli e di concentrarsi sul muscolo DAO. Per valutare il protocollo PAS_{20} sono stati registrati 20 MEP dal muscolo DAO prima dell'applicazione della PAS (MEP pre) e subito dopo (T0), dopo 10 (T10), 20 (T20) e 30 (T30) minuti, sia nella condizione di riposo che nella condizione di attivazione muscolare. Gli effetti del protocollo PAS_{20} sono stati misurati, confrontando l'ampiezza media dei MEP basali con quella dei MEP registrati negli intervalli post-PAS (T0-T30).

Esperimento 3 (effetti di diversi ISI sul DAO a riposo).

Dei 15 soggetti arruolati nell'esperimento 2, 13 hanno partecipato a questo esperimento. Tra l'esperimento due e tre intercorreva almeno una settimana per evitare che ci fossero interferenze tra i due protocolli. Il protocollo PAS era uguale a quello somministrato nell'esperimento 2 eccetto che per l'intervallo interstimolo, che nel presente esperimento era 10 ms (PAS_{10}). Gli effetti della PAS_{10} sono stati misurati solo nella condizione di riposo, confrontando le ampiezze medie ($n=20$) dei MEP registrati prima del protocollo con quelle dei MEP ottenuti dopo 0, 10, 20 e 30 minuti dal protocollo PAS_{10} .

Esperimento 4 (effetti della PAS₂₀ sul muscolo APB).

In nove soggetti è stato valutato l'effetto della stimolazione elettrica del nervo mediano accoppiata alla TMS dell'area motoria della mano controlaterale, ad un ISI di 20 ms. Il protocollo PAS_{APB} consisteva di 200 coppie di stimoli (Ziemann et al., 2004). L'intensità di stimolo del nervo mediano era circa tre volte la soglia percettiva ed era sufficiente ad evocare una risposta motoria visibile nel muscolo APB. L'intensità della TMS era settata al 110% della RMT. L'ampiezza del MEP test era più bassa rispetto a quella classicamente utilizzata in studi precedenti (Stefan et al.2000; Wolters et al.2003; Ziemann et al., 2004) in modo che il MEP ottenuto nell'APB fosse comparabile con quello ottenuto nel DAO. Sono stati misurati 20 MEP dal muscolo APB prima dell'applicazione della PAS_{APB} e subito dopo (T0), dopo 10 (T10), 20 (T20) e 30 (T30) minuti per valutare di effetto del protocollo PAS_{APB}.

Esperimento 5 (tDCS nella corteccia motoria facciale).

In tre soggetti studiati nell'esperimento 2 è stata applicata, come esperimento di controllo, la tDCS anodica in corrispondenza dell'area motoria facciale, per valutare la possibilità di evocare LTP con meccanismi differenti da quelli implicati nella PAS. Dopo aver sgrassato e pulito la cute, è stato ricercato l'hot spot corrispondente alla corteccia motoria facciale tramite TMS e marcato il punto sullo scalpo con una penna dermografica. In questo punto è stato applicato l'elettrodo stimolante, mentre l'elettrodo di riferimento è stato posizionato sulla fronte, sopra l'orbita controlaterale. I due elettrodi a spugna sono stati imbevuti di soluzione fisiologica. La direzione della corrente utilizzata era quella efficace ad evocare LTP nella corteccia motoria del distretto degli arti superiori ed inferiori (anodica) come riportato da precedenti studi (Rev. In: Nitsche et al., 2008). Il

protocollo tDCS consisteva nella somministrazione di corrente continua per la durata di 13 minuti (pari alla durata del protocollo PAS) erogata all'intensità di 1 mA. Per evitare fastidi dovuti al brusco passaggio tra stimolazione e non stimolazione, la corrente veniva gradualmente aumentata e diminuita in fase di inizio e fine del protocollo, rispettivamente. Gli effetti della tDCS sono stati misurati solo nella condizione di riposo, confrontando le ampiezze medie ($n=20$) dei MEP registrati prima del protocollo con quelle dei MEP ottenuti dopo 0, 10, 20 e 30 minuti dalla tDCS.

2.6. Analisi dei dati

L'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS versione 18 (SPSS Inc, Chicago, Illinois USA) utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA per misure ripetute) o il test t di Student. Nel caso di valori significativi della F , è stata applicata l'analisi *post hoc* utilizzando il t test. Per tutte le analisi è stato considerato significativo il valore della $p < 0.05$.

Nell'esperimento 1 per valutare l'effetto della stimolazione elettrica periferica sul MEP per i diversi ISIs è stata applicata l'ANOVA per misure ripetute utilizzando il fattore ISI (5, 10, 15, 20, 25 e 30 ms) come “*within subject factor*”, separatamente per la condizione di riposo e di attività muscolare.

Nell'esperimento 2 e 5 è stata utilizzata l'ANOVA ad una via per valutare gli effetti della PAS₂₀ e della tDCS sul MEP dei muscoli facciali, utilizzando il fattore “*time course*” (T0, T10, T20 e T30) come “*within subject factor*”, sui MEP evocati nel DAO a riposo (PAS₂₀ e tDCS) e durante contrazione volontaria (PAS₂₀).

Nell'esperimento 3 è stata utilizzata l'ANOVA a due vie per misure ripetute, con ISI (20 ms *versus* 10 ms) e "time course" come "*within subject factors*".

Nell'esperimento 4 è stata utilizzata l'ANOVA per misure ripetute a due vie, con "Muscolo" (DAO *versus* FDI) e "time course" per confrontare l'effetto del protocollo PAS nel distretto facciale e della mano.

In caso di risultati significativi nell'ANOVA ad una via, è stato utilizzato il test di Fisher LSD come analisi *post hoc* per confrontare le ampiezze dei MEP pre- e post-PAS. Per l'ANOVA a due vie, in caso di interazione significativa, è stato utilizzato il *post hoc* t test per campioni appaiati, per confrontare gli effetti dei diversi ISI. Nei modelli lineari è stata testata la sfericità con il Mauchly's test. Se necessario (Mauchly's test <0.05) è stata applicata la correzione Greenhouse-Geisser. Tutti i dati se non diversamente specificato sono stati espressi come media \pm errore standard.

3. RISULTATI

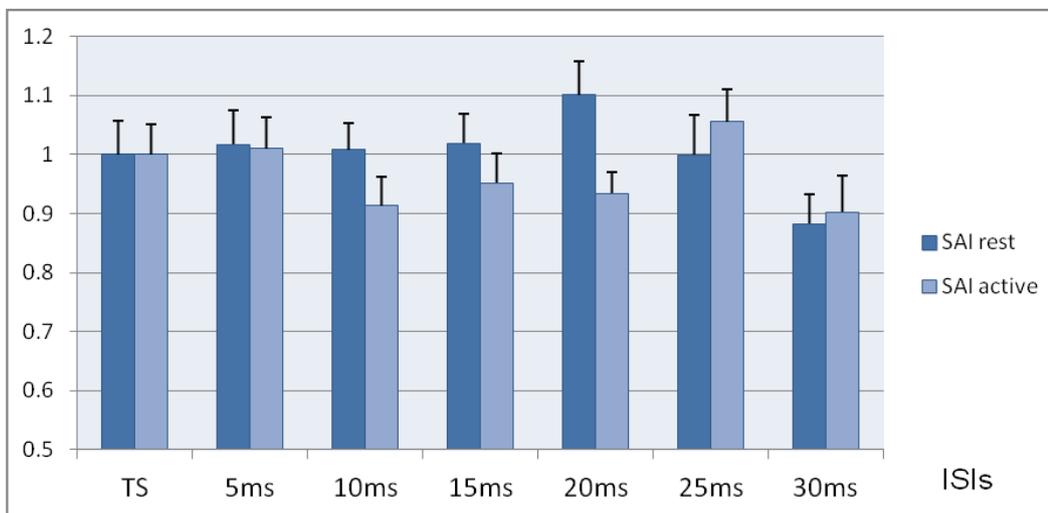
In tutti i 15 soggetti studiati è stato possibile evocare i MEP dal muscolo DAO controlaterale, sia a riposo che durante contrazione. La RMT era $50.54 \pm 0.19\%$ mentre la AMT era $42.73 \pm 0.18\%$ del MSO, nelle due rispettive condizioni sperimentali. Il valore medio della EMT per la stimolazione del nervo facciale era 3.97 ± 0.08 mA, circa tre volte la soglia percettiva del soggetto (1.41 ± 0.05 mA), intensità sufficiente a evocare una risposta periferica nel muscolo DAO ipsilaterale. I valori medi di latenza all'onset e al picco nel DAO a riposo erano 10.50 ± 0.06 ms e 15.67 ± 0.09 ms, rispettivamente. Nella condizione di attivazione la latenza all'onset era 9.55 ± 0.06 ms e la latenza al picco 14.9 ± 0.07 ms. Il Test *t* di Student ha mostrato una differenza significativa di latenza all'onset sia a riposo che

durante attivazione muscolare ($p=0.011$), mentre non c'era differenza di latenza al picco. Le ampiezze medie del MEP evocato utilizzando il TS al 100% della RMT erano di 0.146 ± 0.02 mV per la condizione di riposo e 0.557 ± 0.04 per i MEP registrati durante il 10% della MVC.

Esperimento 1 (Effetti della stimolazione di un nervo periferico sulla risposta evocata dalla TMS della corteccia motoria facciale).

In questo esperimento è stato applicato il paradigma della SAI messo a punto da Tokimura (2000) nei muscoli dell'eminenza tenar della mano, per lo studio dell'integrazione sensori-motoria del sistema motorio facciale. Sono stati testati gli effetti della stimolazione del nervo facciale sui MEP di dodici soggetti nella condizione di riposo e di nove soggetti durante attivazione muscolare. L'ANOVA ad una via non ha messo in evidenza alcun effetto significativo della stimolazione del nervo facciale sul MEP del DAO, per nessuno degli ISI testati, sia nella condizione di riposo che durante attivazione muscolare (figura 1A). Sui quattro soggetti in cui è stato testato l'effetto della stimolazione del nervo facciale sul DAO a riposo, come per la stimolazione del nervo facciale, non è stato evidenziato alcun effetto significativo, per nessuno degli intervalli testati (figura 1B).

A: Effetti della ES sul cMEP a riposo e durante attivazione



B: Effetti della stimolazione facciale e trigeminale sul cMEP a riposo

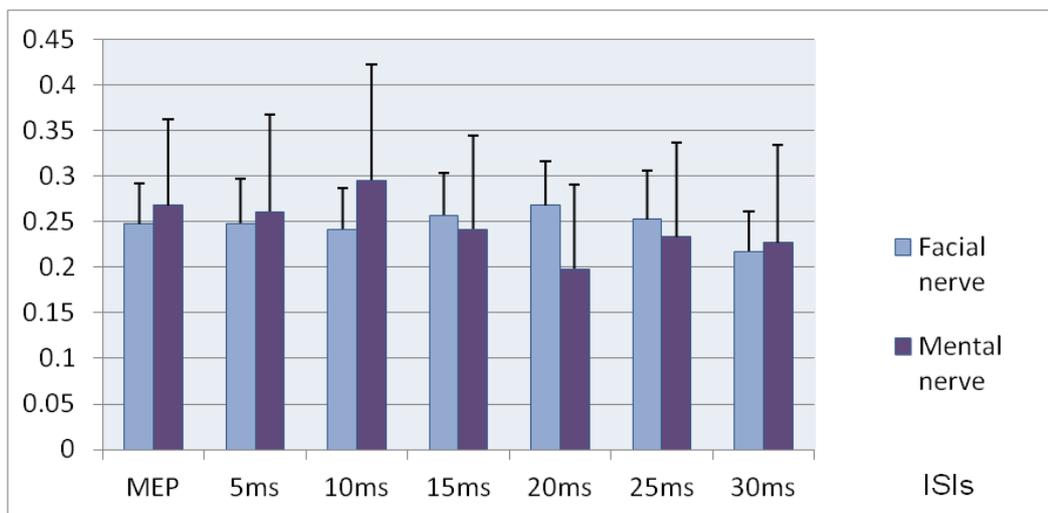


Figura 1

Negli istogrammi sono riportati gli effetti della stimolazione elettrica periferica sul cMEP. A: Effetti della stimolazione elettrica del nervo facciale sul cMEP nella condizione di riposo (SAI rest) e diattivazione muscolare (SAI active). B: Effetti della stimolazione del nervo facciale (facial nerve) e mentale (mental nerve) sul cMEP a riposo. Non è stato evidenziato alcun cambiamento significativo nell'ampiezza dei MEP condizionati dallo stimolo elettrico. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

Esperimento 2 (effetti del protocollo PAS utilizzando 20 ms di ISI sui muscoli facciali a riposo e durante attivazione (PAS₂₀)).

La domanda a cui si voleva rispondere in questo esperimento era se la stimolazione ripetitiva della corteccia motoria attraverso due vie indipendenti, ma che arrivavano in maniera sincrona a livello corticale, fosse in grado di indurre cambiamenti duraturi nell'eccitabilità corticale dell'area facciale, in analogia a quanto accade per i muscoli degli arti. Gli esperimenti pilota condotti su tre soggetti per testare gli effetti della stimolazione del nervo mentale o facciale hanno messo in evidenza che la PAS_{tri} non dava aumenti di ampiezza del MEP ma addirittura un trend inibitorio (dati non analizzati per esiguità del campione). Invece, la stimolazione ripetitiva del nervo facciale, effettuata 20 ms prima della stimolazione magnetica della corteccia motoria facciale controlaterale (protocollo PAS₂₀) ha provocato un'aumento di ampiezza del MEP a riposo da un valore medio di 0.146 ± 0.12 mV ad un valore di 0.192 ± 0.14 mV ($p=0.001$), ha indotto, cioè un aumento medio dell'ampiezza del MEP del 32%, in tutti i soggetti testati eccetto 2. L'ampiezza del MEP in condizione di contrazione volontaria prima del protocollo PAS era 0.543 ± 0.42 mV, mentre dopo la PAS₂₀ era 0.576 ± 0.37 mV. Il t test di Student non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i MEP in attivazione muscolare registrati prima e dopo la PAS. L'analisi della varianza ad una via per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto significativo del "time course" (MEP pre, T0, T10, T20 e T30) sull'ampiezza del MEP controlaterale, nella condizione di riposo ($p=0.024$). L'analisi *post hoc* ha rivelato una differenza significativa tra i MEP pre e i MEP registrati al T0 ($p=0.013$), T10 ($p=0.007$), T20 ($p=0.005$) e T30 ($p=0.023$). L'ANOVA non ha messo in evidenza alcun effetto significativo nella condizione di attivazione muscolare (figura 2).

Effetti della PAS 20ms ISI sul cMEP a riposo e durante attivazione

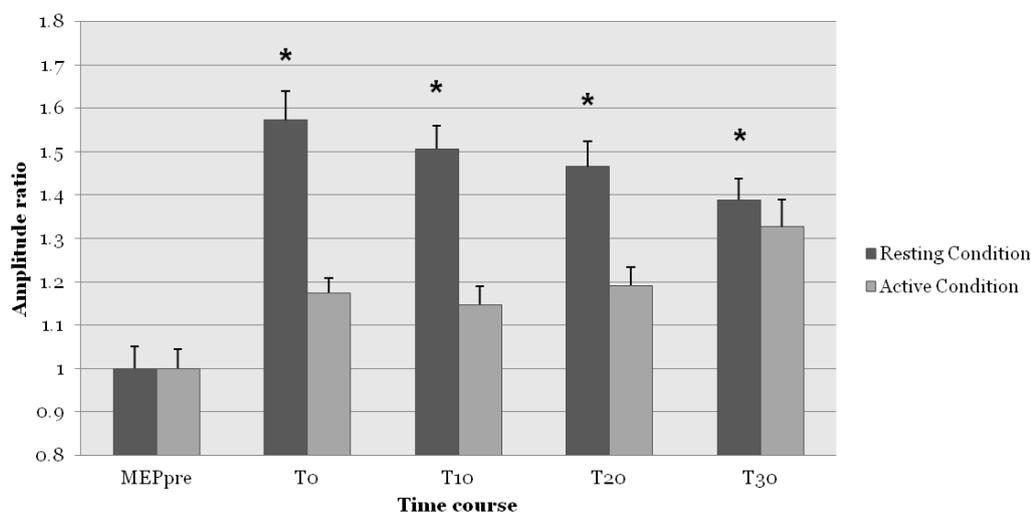


Figura 2

Negli istogrammi sono riportati gli effetti del protocollo PAS₂₀ sul MEP a riposo (Resting Condition) e durante attivazione muscolare (Active Condition). Si può notare un significativo aumento di ampiezza del MEP per tutti gli intervalli post-PAS testati nella condizione di riposo. Al contrario, non è stato evidenziato alcun cambiamento significativo nell'ampiezza dei MEP attivato volontariamente. Le ampiezze (Amplitude) sono state espresse come Ratio tra MEP condizionato e non condizionato. Asterischi: $p < 0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

Esperimento 3 (effetti di diversi ISI sul DAO a riposo).

Per esaminare se 20 ms ISI fosse l'intervallo migliore per evocare LTP nella corteccia motoria facciale è stato testato l'ISI di 10 ms. L'effetto del protocollo PAS₁₀ sul MEP a riposo è stato testato in 13 soggetti che avevano partecipato all'esperimento 2. L'ANOVA a due vie (ISI*time course) ha mostrato un'interazione significativa tra ISI e "time course" ($p = 0.015$). L'analisi *post hoc* eseguita separatamente per il protocollo PAS₂₀ e PAS₁₀ utilizzando loil t test di Student, ha messo in evidenza che l'ISI di 10 ms non era efficace nel facilitare l'ampiezza del MEP per nessuno degli intervalli post-PAS testati. Invece il protocollo PAS in cui si utilizzava un

ISI di 20 ms era in grado di facilitare il MEP per tutti gli intervalli testati (T0 $p=0.017$; T10 $p=0.001$; T20 $p=0.015$; T30 $p=0.045$). I risultati sono mostrati nella figura 3.

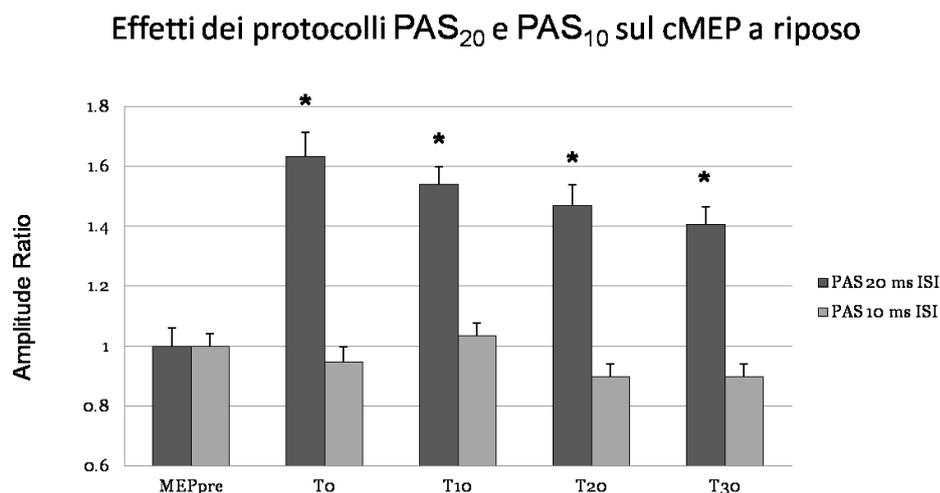


Figura 3

Negli istogrammi sono riportati gli effetti del protocollo PAS₂₀ e PAS₁₀ sul MEP a riposo. Si può notare un significativo aumento di ampiezza del MEP per tutti gli intervalli post PAS₂₀. Non è stato evidenziato invece alcun cambiamento significativo nell'ampiezza dei MEP dopo somministrazione del protocollo PAS₁₀. Le ampiezze sono state espresse come Ratio tra MEP condizionato e non condizionato. Asterischi: $p < 0.05$. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

Esperimento 4 (effetti della PAS₂₀ sul muscolo APB).

Per valutare se l'effetto facilitatorio ottenuto sul muscolo DAO con la PAS₂₀ era simile a quello ottenuto applicando lo stesso protocollo al distretto motorio della mano, abbiamo comparato gli effetti della stimolazione ripetitiva del nervo facciale accoppiata con la TMS della corteccia motoria facciale con gli effetti ottenuti accoppiando la stimolazione del nervo mediano con la TMS dell'area motoria della mano. L'ANOVA a due vie con "muscolo" (DAO *versus* APB) e "time course" non

ha evidenziato alcuna differenza di muscolo stimolato, time course e interazione muscolo*time course, suggerendo che entrambi i protocolli sono facilitatori.

Esperimento 5 (tDCS nella corteccia motoria facciale).

Nell'esperimento di controllo su tre soggetti in cui è stata applicata la tDCS anodica in corrispondenza dell'area motoria facciale, l'ANOVA a due vie con "Protocollo" (PAS₂₀ versus tDCS) e "time course" non ha evidenziato alcuna differenza di protocollo, time course e interazione protocollo*time course, suggerendo che entrambi i protocolli sono facilitatori (figura 4).

Effetti dei protocolli PAS₂₀ e tDCS sul cMEP a riposo

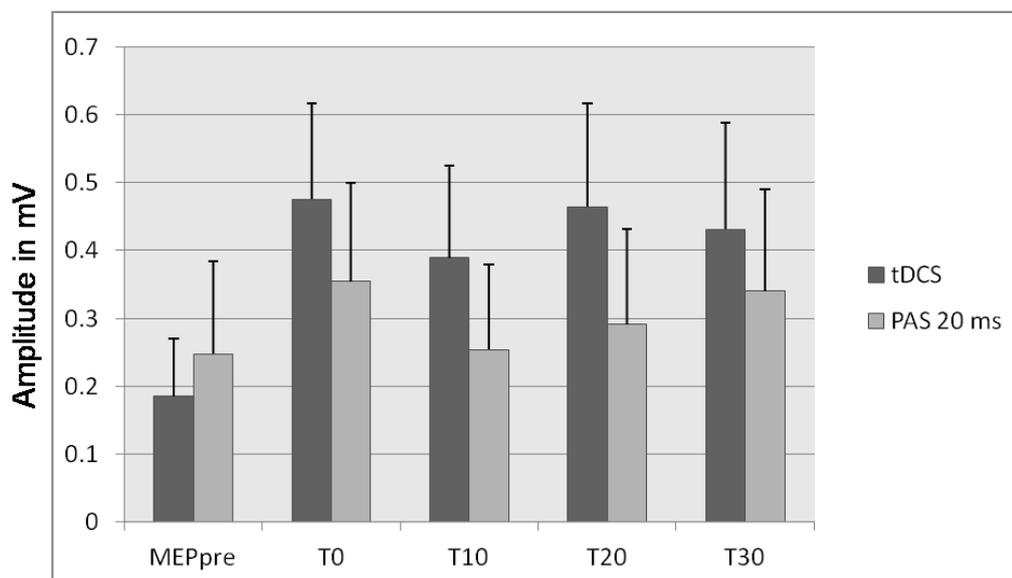


Figura 3

Negli istogrammi sono riportati gli effetti del protocollo PAS₂₀ e tDCS sul MEP a riposo. Si può notare che entrambi i protocolli facilitano il MEP per tutti gli intervalli testati. Le ampiezze sono state espresse in mV. I dati sono mostrati come media \pm errore standard (barre di errore).

4. DISCUSSIONE

Il presente studio ha dimostrato per la prima volta che accoppiando la stimolazione del nervo facciale con la TMS della corteccia motoria facciale controlaterale è possibile indurre cambiamenti plastici nel sistema motorio facciale. Nonostante ciò, un dato sorprendente emerso dai nostri esperimenti è la mancanza dell'inibizione afferente del MEP corticale per stimolazione periferica.

Apprendimento motorio e plasticità corticale nel distretto facciale.

Si pensa che, nell'uomo sano, l'integrazione dell'input sensitivo con l'output motorio che abbia un ruolo fondamentale non solo nel controllo dei movimenti fini, ma anche nell'apprendimento motorio (Asanuma e Pavlides, 1997). Nel distretto motorio della mano, la stimolazione accoppiata dell'afferenza sensitiva con l'efferenza motoria permette di testare tale integrazione sensori-motoria (Tokimura et al., 2000; Classen et al., 2000). Nel classico protocollo di SAI sull'arto superiore, Tokimura (2000) ha dimostrato che, affinché l'afferenza esercitasse un effetto inibitorio, gli intervalli interstimolo dovevano essere compresi tra 19 e 25 ms, circa 1-5 ms maggiori della latenza della N20 del SEP del nervo mediano, che è considerato convenzionalmente come il tempo che impiega l'impulso afferente dall'arto superiore, trasportato dal nervo mediano, ad arrivare alla corteccia somatosensitiva controlaterale. Lo stesso principio di accoppiamento di stimolo sensitivo e stimolo motorio ad un intervallo interstimolo pari alla latenza della N20 + 5 ms è alla base del protocollo PAS messo a punto da Stefan et al. (2000) per indurre LTP nella corteccia motoria dell'arto superiore. Si ritiene che le afferenze muscolari siano di importanza fondamentale per il controllo motorio e, probabilmente, anche per la plasticità della corteccia motoria (Hulliger, 1993). Considerato ciò, si

può ipotizzare che la plasticità indotta dal protocollo PAS sia strettamente dipendente dal tipo di stimolazione, che nel caso del nervo mediano eccita principalmente afferenze dai meccanocettori, ma non dai fusi neuromuscolari (Kunesch, 1995). Questo risultato può indicare che le afferenze cutanee sono quelle principalmente coinvolte nella plasticità indotta dalla PAS in assenza di contrazione volontaria.

La stimolazione del nervo facciale nel paradigma “SAI” non ha indotto alcuna modificazione significativa del MEP, per nessuno degli intervalli interstimolo testati, né a riposo né durante attivazione volontaria al 10% della MVC. Una ragione per questa mancanza di effetto può essere che nel nostro set up sperimentale non siamo stati in grado di produrre una scarica afferente sufficientemente intensa e sincrona da inibire il MEP. Nel nostro studio, oltre la stimolazione elettrica del nervo facciale, è stato testato l'effetto della stimolazione elettrica del nervo mentale, branca sensitiva del trigemino, agli stessi ISI utilizzati per la stimolazione del nervo facciale. Anche la stimolazione dell'afferenza puramente sensitiva non ha modificato l'ampiezza del MEP, per nessuno degli intervalli interstimolo testati. Un'altra ipotesi potrebbe essere che l'integrazione sensorimotoria della faccia sia organizzata in maniera diversa rispetto al distretto della mano, proprio come avviene per l'arto inferiore, per la diversità delle funzioni che questi distretti svolgono (Roy e Gorassini, 2008; Bikmullina et al., 2009). Tuttavia, nonostante l'assenza di modulazione del MEP da parte della stimolazione periferica utilizzando il paradigma SAI, la stimolazione ripetitiva accoppiata del nervo facciale con la stimolazione magnetica della corteccia motoria facciale controlaterale, utilizzando un ISI di 20 ms, si è dimostrata efficace nel facilitare la risposta motoria a riposo nella muscolatura inferiore della faccia, in analogia a quanto accade nel distretto motorio della mano e dell'arto inferiore. Possiamo affermare che si tratta di

un fenomeno dovuto alla LTP poiché la plasticità indotta dal protocollo PAS₂₀ durava almeno 30 minuti (come dimostrato dalla facilitazione significativa per tutti gli intervalli post-PAS testati). Non erano necessari lunghi periodi di stimolazione per indurre cambiamenti duraturi del MEP (la durata del protocollo era circa 13 minuti). Inoltre il confronto con la tDCS, altro metodo utilizzato per evocare LTP nella corteccia motoria (Rev in: Nitsche and Paulus, 2000), non ha evidenziato differenze tra i due protocolli. I cambiamenti indotti dalla PAS₂₀ nelle ampiezze dei MEP a riposo dipendevano dalla convergenza temporale della stimolazione della via periferica. Infatti il protocollo PAS che utilizzava 10 ms come ISI non evocava nessun aumento significativo del MEP , ma bensì un effetto inibitorio in buona parte dei soggetti testati. Un altro dato a favore di un fenomeno di LTP era che il protocollo PAS applicato alla corteccia motoria facciale non mostrava differenze di effetto se paragonato al protocollo applicato alla corteccia motoria dei muscoli della mano.

Dire qualcosa sulla differenza di meccanismi PAS e tDCS

CONCLUSIONI

I risultati del nostro lavoro contribuiscono a chiarire alcuni aspetti importanti della fisiologia del sistema motorio facciale.

Nello STUDIO 1 abbiamo dimostrato che anche l'area motoria che proietta ai motoneuroni facciali che controllano la muscolatura inferiore del volto è regolata dai circuiti inibitori a breve latenza (SICI) e facilitatori (ICF), sia a riposo che durante attivazione muscolare. Questo risultato ha chiarito i dati contrastanti in letteratura, dimostrando che i circuiti inibitori GABAergici e quelli facilitatori glutamatergici operano nella corteccia motoria facciale dell'uomo sano anche in condizione di attivazione muscolare. Questo dato è estremamente interessante se consideriamo che la corteccia motoria facciale è spesso sede di disturbi del movimento in cui tali circuiti risultano alterati, e proprio per le caratteristiche della patologia (vedi le distonie craniofacciali, spasmo emifacciale, tic, ecc) che comportano una attivazione pressochè perenne della muscolatura, rendendo difficile se non impossibile lo studio della muscolatura a riposo.

Inoltre i dati ottenuti suggeriscono ulteriormente la bilateralità ed asimmetria delle proiezioni cortico-facciali dirette alla muscolatura inferiore del volto. Vanno approfonditi gli studi sulla stimolazione dell'emisfero destro, in cui sono stati dimostrati la SICI e la ICF solamente nella condizione di riposo, risultato dovuto probabilmente al piccolo numero di soggetti testati.

Nello STUDIO 2 è stato dimostrato per la prima volta che è possibile evocare LTP nella corteccia motoria della muscolatura facciale a riposo nonostante l'output motorio facciale sembri non essere influenzato dalla stimolazione periferica. È stato dimostrato che la LTP può essere indotta

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

solo nel MEP a riposo, stimolando il nervo facciale e non il nervo trigemino, utilizzando come intervallo interstimolo 20 ms. Questo dato suggerisce che i meccanismi fisiologici alla base dell'apprendimento nel sistema motorio facciale sono analoghi a quelli del sistema motorio degli arti superiori ed inferiori. Sono necessari ulteriori studi per chiarire se in questo distretto sia possibile anche evocare LTD e quale sia l'intervallo interstimolo da utilizzare, considerando che l'ISI di 10 ms solo in una parte del campione da noi testato. Altro punto da chiarire è come mai la stimolazione delle afferenze sensitive cutanee trigeminali non è stata in grado di modulare l'eccitabilità della corteccia motoria facciale se nel distretto motorio della mano anche la sola stimolazione delle terminazioni nervose delle dita evoca LTP. Per quanto riguarda il controllo motorio e l'integrazione sensorimotoria nel distretto facciale, andrebbero fatti ulteriori studi sul ruolo delle influenze emotive sottocorticali o delle influenze troncoencefaliche che potrebbero giocare un ruolo importante nel controllo e nell'esecuzione dei movimenti del viso.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

BIBLIOGRAFIA

A

Abbruzzese G, Assini A, Buccolieri A, Schieppati M & Trompetto C (1999). Comparison of intracortical inhibition and facilitation in distal and proximal arm muscles in humans. *J Physiol* **514**, 895-903.

Abeles M. Corticonics. Neural circuits of the cerebral cortex. (1991). Cambridge University Press.

Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, Dragunow M (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci* **22**; 9626-34.

Alberini CM, Ghirardi M, Huang YY, Nguyen PV, Kandel ER (1995). A molecular switch for the consolidation of long-term memory: cAMP- inducible gene expression. *Ann NY Acad Sci* **758**; 261-86.

Amassian VE & Weiner H (1966). Monosynaptic and polysynaptic activation of pyramidal tract neurons by thalamic stimulation. In: Purpura DP, Yahr MD, eds. The thalamus. New York: Columbia University Press, 255– 82.

Amassian VE, Eberle L, Maccabee PJ & Cracco RQ (1992). Modelling magnetic coil excitation of human cerebral cortex with a peripheral nerve immersed in a brain-shaped volume conductor: the significance of fiber bending in excitation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**, 291–301.

Amassian VE, Stewart M, Quirk GJ & Rosenthal JL (1987). Physiological basis of motor effects of a transient stimulus to cerebral cortex. *Neurosurgery* **20**, 74 –93.

Andersen P, Sundberg SH, Sveen O, Swann JW, Wigström H (1980). Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in the hippocampal slices from guinea-pigs. *J Physiol* **302**; 463-82.

Awiszus F & Feistner H (1994a). Correlations between size parameters and the amplitude of the excitatory postsynaptic potential evoked by magnetic brain stimulation in human hand muscle motoneurons. *Exp Brain Res* **98**, 128 –34.

Awiszus F & Feistner H (1994b). Quantification of D- and I-wave effects evoked by transcranial magnetic brain stimulation on the tibialis anterior motoneuron pool in man. *Exp Brain Res* **101**, 153– 8.

Awiszus F, Feistner H, Urbach D & Bostock H (1999). Characterisation of paired-pulse

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

transcranial magnetic stimulation conditions yielding inhibition or I-wave facilitation using a threshold-hunting paradigm. *Exp Brain Res* **129**, 317–324

B

Barker AJ, Jalinous R & Freeston IL (1985). Non-invasive stimulation of human motor cortex. *Lancet* **II**, 1106–1107.

Barrionuevo G; Brown TH (1983). Associative long-term potentiation in Hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**; 7347-51.

Beinsteiner R, Windischberger C, Lanzenberger R, Edward V, Cunnington R, Erdler M, et al. (2001) Finger somatotopy in human motor cortex. *Neuroimage* **13**; 1016-26

Benecke R, Meyer BU, Schonle P & Conrad B (1988). Transcranial magnetic stimulation of the human brain: responses in muscles supplied by cranial nerves. *Exp. Brain. Res.* **71**, 623-632.

Berardelli A, Inghilleri M, Cruccu G & Manfredi M (1990). Descending volley after electrical and magnetic transcranial stimulation in man. *Neurosci Lett* **112**, 54–8.

Berardelli A, Rona S, Inghilleri M & Manfredi M (1996). Cortical inhibition in Parkinson's disease. A study with paired magnetic stimulation. *Brain* **119**, 71-7.

Bi GQ, Poo MM (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength and postsynaptic cell type. *J Neurosci* **18**; 10464-72.

Bikmullina R, Bäumer T, Zittel S, Münchau A (2009). Sensory effect inhibition within and between limbs in humans. *Clinical Neurophysiology* **120**; 610-618.

Bliss TVP, Garden-Medwin AR (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**; 357-74.

Bliss TV, Lomo T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**; 331-56.

Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar G, et al.(1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* **280**, 1940-2.

Boniface SJ, Mills KR & Schubert M (1991). Responses of single spinal motoneurons to magnetic brain stimulation in healthy subjects and patients with multiple sclerosis. *Brain* **114**, 643– 62.

Boyd SG, Rothwell JC, Cowan JMA, Webb PJ, Morley T, Asselman P & Marsden CD (1986). A method of monitoring function in cortical pathways during scoliosis surgery with a note on motor conduction velocities. *J Neurol Neurosurg Psych* **49**, 251–257.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Brasil-Neto JP, Cohen LG, Panizza M, Nilsson J, Roth BJ & Hallett M (1992). Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity. *J Clin Neurophysiol* **9**, 132-6.

Bredman JJ, Weijs WA, Moorman AF & Brugman P (1990). Histochemical and functional fibre typing of the rabbit masseter muscle. *J Anat* **168**, 31-47

Brodal A (1981). Neurological anatomy in relation to clinical medicine, 3rd ed. New York: Oxford University Press; 495-508.

Burke D, Hicks R & Stephen J (1992). Anodal and cathodal stimulation of the upper-limb area of the human motor cortex. *Brain* **115**, 1497-508

Burke D, Hicks RG & Stephen J (1990). Corticospinal volleys evoked by anodal and cathodal stimulation to the human motor cortex. *J Physiol* **425**, 283-299.

Burke D, Hicks RG, Gandevia SC, Stephen J, Woodforth I & Crawford M (1993). Direct comparison of corticospinal volleys in human subjects to transcranial magnetic and electric stimulation. *J Physiol* **470**, 383-393.

Butler SL, Miles TS, Thompson PD & Nordstrom MA (2001). Task dependent control of human masseter muscles from ipsilateral and contralateral motor cortex. *Exp Brain Res* **137**, 65-70.

C

Cantello R, Gianelli M, Civardi C & Mutani R (1992). Magnetic brain stimulation: the silent period after the motor evoked potential. *Neurology* **42**, 1951-9.

Carr, LJ, Harrison LM & Stephens JA (1994). Evidence for bilateral innervation of certain homologous motoneurone pools in man. *J Physiol* **475**, 217-227.

Chen R & Garg R (2000). Facilitatory I wave interaction in proximal arm and lower limb muscle representations of the human motor cortex. *J Neurophysiol* **83**, 1426-1434

Chen R, Lozano AM & Ashby P (1999a). Mechanism of the silent period following transcranial magnetic stimulation. Evidence from epidural recordings. *Exp Brain Res* **128**, 539-542.

Chen R, Corwell B & Hallett M (1999b). Modulation of motor cortex excitability by median nerve and digit stimulation. *Exp Brain Res* **129**, 177-86

Chen R, Tam A, Bütetfisch C, Corwell B, Ziemann U, Rothwell J & Cohen LG (1998). Intracortical inhibition and facilitation in different representations of the human motor cortex. *J Neurophysiol* **80**, 2870-2881.

t SF, Errington ML, Plattner F, Bradshaw KD, Hirano A, Peters, et al. (2004) Long-term potentiation at perforant pth-granule cell synapses does not require phosphorylation of ?-CaMKII at threonine 286. *Foromu European Neurosci Abstr* **4.A015.13**.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Cheney PD & Fetz EE (1980). Functional classes of primate corticomotoneuronal cells and their relation to active force. *J Neurophysiol* **44**, 773–91.

Classen J, Steinfelder B, Liepert J, Stefan K, Celnik P, Cohen LG, Hess A, Kunesch E, Chen R, Benecke R & Hallett M (2000). Cutaneomotor integration in humans is somatotopically organized at various levels of the nervous system and is task dependent. *Exp Brain Res* **130**, 48–59.

Claus D, Weis M, Jahnke U, Plewe A, & Brunholzl C (1992). Corticospinal conduction studied with magnetic double stimulation in the intact human. *J Neurol Sci* **111**, 180–8.

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* **334**, 33–46.

Connors BW, Malenka RC & Silva LR (1988). Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABAA and GABAB receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J Physiol* **406**, 443–68.

Connor NP, Abbs JH (1998). Movement-related skin strain associated with goal oriented lip actions. *Exp Brain Res* **123**, 235–241.

Creutzfeldt OD, Lux HD & Nacimiento AC (1964). Intracelluläre Reizung corticaler Nervenzellen. *Pflügers Arch* **281**, 129–51.

Cruccu G, Agostino R, Lahuerta J & Manfredi M (1986). Inhibition of jaw-closing muscles by electrical stimulation of the ophthalmic division in man. *Brain Research* **371**, 298–304.

Cruccu G, Berardelli A, Inghilleri M & Manfredi M (1989). Functional organisation of the trigeminal motor system in man. A neurophysiological study. *Brain* **112**, 1333–1350.

Cruccu G, Berardelli A, Inghilleri M, Manfredi M (1990a). Corticobulbar projections to upper and lower facial motoneurons. A study by magnetic transcranial stimulation in man. *Neurosci Lett.* **117(1-2)**, 68–73.

Cruccu G, Inghilleri M, Berardelli A, Pauletti G & Manfredi M (1990b). Cortico-facial and cortico-trigeminal projections. A comparison by magnetic brain stimulation in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* **41**, 140–144.

Cruccu G, Inghilleri M, Berardelli A, Romaniello A & Manfredi M (1997). Cortical mechanisms mediate the inhibitory period after magnetic stimulation of the facial motor area. *Muscle Nerve* **20**, 418–424.

D

Damasio AR (1994). *Descartes' Error*. New York: Putamen's Sons 140–142

Davey NJ, Romauger P, Maskill DW & Ellaway PH (1994). Suppression of voluntary motor activity revealed using transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in man. *J Physiol* **477**, 223–35.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Day BL, Dressler D, Maertens de Noordhout A, Marsden CD, Nakashima K, Rothwell JC & Thompson PD (1989). Electric magnetic stimulation of human motor cortex: surface EMG and single motor unit responses. *J Physiol* **412**, 449–473.

Day BL, Rothwell JC, Thompson PD, Dick JP, Cowan JM, Berardelli A & Marsden CD (1987). Motor cortex stimulation in intact man. 2. Multiple descending volleys. *Brain* **110**, 1191–209.

Dechent P, Frahm J (2003) Functional somatotopy on finger representations in human primary cortex. *Human Brain Mapp* **18**; 272-83.

DeFelipe J, Conley M & Jones EG (1986). Long-range focal collateralization of axons arising from corticocortical cells in monkey sensory–motor cortex. *J Neurosci* **6**, 3749–66.

Dellow PG & Lund JP (1971) Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J Physiol* **215**, 1-13

Deriu F, Milia M, Sau G, Podda MV, Ortu E, Giaconi E, Aiello I & Tolu E (2003a). Modulation of masseter exteroceptive suppression by non-nociceptive upper limb afferent activation in humans. *Exp Brain Res* **150**, 154-162

Deriu F, Ortu E, Capobianco S, Giaconi E, Melis F, Aiello E, Rothwell JC & Tolu E (2007). Origin of sound-evoked EMG responses in human masseter muscles. *J Physiol* **580**, 195-209

Deriu F, Podda MV, Milia M, Chessa G, Sau G, Pastorino M, Aiello I & Tolu E (2000). Masseter muscle activity during vestibular stimulation in man. *Arch Ital Biol* **138**, 205-215

Deriu F, Tolu E & JC Rothwell (2003b). A short latency vestibulomasseteric reflex evoked by electrical stimulation over the mastoid in healthy humans. *J Physiol* **553**, 267-279.

Deriu F, Tolu E & Rothwell JC (2005). A sound-evoked vestibulomasseteric reflex in healthy humans. *J Neurophysiol* **93**, 2739–2751.

Derkach V, Barria A, Soldering TR (1999) Ca²⁺/calmodulin kinase II enhances channel conductive of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**; 3269-74.

Desiato MT, Bernardi G, Hagi HA, Boffa L & Caramia MD (2002). Transcranial magnetic stimulation of motor pathways directed to muscles supplied by cranial nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* **113**, 132–40.

Deudek SM, Bear MF(1992). Homosynaptic long-term depression and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**; 4363-7.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Meglio M, Cioni B, Tamburrini G, Tonali P & Rothwell JC (2000). Direct demonstration of the effect of lorazepam on the excitability of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* **111**, 794–9.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Dileone M, Mazzone P, Insola A, Tonali PA & Rothwell JC (2004). The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in

Pilurzi Giovanna
Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica
Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

conscious humans. *Clin Neurophysiol* **115**, 255–266.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, Meglio M, Cioni B, Tonali P & Rothwell JC (2001). Descending spinal cord volleys evoked by transcranial magnetic and electrical stimulation of the motor cortex leg area in conscious humans. *J Physiol* **537**, 1047–1058.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, Saturno E, Pilato F, Insola A, Mazzone P, Tonali P & Rothwell JC (1998a). Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in conscious humans. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **109**, 397–401

Di Lazzaro V, Restuccia D, Oliviero A, Profice P, Ferrara L, Insola A, Mazzone P, Tonali P & Rothwell JC (1998b). Effects of voluntary contraction on descending volleys evoked by transcranial stimulation in conscious humans. *J Physiol* **508**, 625–33

Di Lazzaro V, Restuccia D, Oliviero A, Profice P, Ferrara L, Insola A, Mazzone P, Tonali P & Rothwell JC (1998c). Magnetic transcranial stimulation at intensities below active motor threshold activates intracortical inhibitory circuits. *Exp Brain Res* **119**, 265–268.

Dubach P, Guggisberg AG, Rösler KM, Hess CW, Mathis J (2004). Significance of coil orientation for motor evoked potentials from nasalis muscle elicited by transcranial magnetic stimulation. *Clinical Neurophysiology* **115**; 862-870.

Dubner R, Sessle BJ & Storey AT (1978). The neural basis of oral and facial function. Plenum, New York

Dudek SM, Bear MF.(1992). Homosynaptic long-term depression and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**;4363-7.

E

Edgley SA, Eyre JA, Lemon RN & Miller S (1990). Excitation of the corticospinal tract by electromagnetic and electric stimulation of the scalp in the macaque monkey. *J Physiol* **425**, 301-320.

Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**;66-70.

Epstein CM, Schwartzberg DG, Davey KR & Sudderth DB (1990). Localizing the site of magnetic brain stimulation in humans. *Neurology* **40**, 666 –70.

Errington ML, Lynch MA, Bliss TV (1987). Long-term potentiation in the dentate gyrus: indication and increased glutamate release and blocked by D(-) aminophosphonovalerate. *Neuroscience* **20**; 279-84.

Estaban A(1999). A neurophysiological approach to brainstem reflex. Blink reflex. *Neurophysiol Clin* **29**; 7-38.

Evarts EV (1968). Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *J Neurophysiol* **31**, 14 –27.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Evarts EV, Fromm C, Kroller J, Jennings VA (1983). Motor cortex control of finely graded forces. *J Neurophysiol* **49**,1199–215.

Evinger C, Bao JB, Pwers AS et al.(2002). Dry eye, blinking, and blepharospasm. *Mov Disord* **17**; S75-S78.

F

Fay RA, Norgren R (1997). Identification of rat brain multisynaptic connections to the oral motor nuclei in the rat using pseudorabies virus II. Facial muscle motor systems. *Brain Research Review* **25**; 276-290.

Fisher RJ, Nakamura Y, Bestmann S, Rothwell JC & Bostock H (2002). Two phases of intracortical inhibition revealed by transcranial magnetic threshold tracking. *Exp Brain Res* **143**, 240–8.

Folkins JW, Larson CR (1978). In search of a tonic vibration reflex in the human lip. *Brain Res* **151**; 409-412.

Fox K (2002). Anatomical pathways and molecular mechanism for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* **111**;799-814.

Fuhr P, Agostino R & Hallett M (1991). Spinal motor neuron excitability during the silent period after cortical stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **81**, 257–262.

Fujiki M, Isono M, Hori S & Ueno S (1996). Corticospinal direct response to transcranial magnetic stimulation in humans. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **101**, 48 –57.

G

Geyer S, Ledberg A, Schleicher A, Kinomura S, Schormann T, Burgel U, Klingberg T, Larsson J, Zilles K & Roland PE (1996). Two different areas within the primary motor cortex of man. *Nature* **382**: 805-807.

Ghosh S & Porter R (1988). Corticocortical synaptic influences on morphologically identified pyramidal neurones in the motor cortex of the monkey. *J Physiol* **400**, 617–29.

Godaux E, & Desmedt JE (1975) Exteroceptive suppression and motor control of the masseter and temporalis muscles in normal man. *Brain Research* **85**, 447-458.

Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986). The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature* **322**; 419-22.

Goldberg LJ & Tal M (1978). Intracellular recording in trigeminal motoneurons of the anesthetized guinea pig during rhythmic jaw movement. *Exp Neurol* **58**, 101-110

Gooden BR, Ridding MC, Miles TS, Nordstrom MA & Thompson PD (1999). Bilateral cortical control of the human anterior digastric muscles. *Exp Brain Res* **129**, 582–91.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Gualtierotti T & Paterson AS (1954). Electric stimulation of the unexpected cerebral cortex. *J Physiol* **125**, 278–291.

Guggisberg AG, Dubach P, Hess CW, Wuthrich C & Mathis J (2001). Motor evoked potentials from masseter muscle induced by transcranial magnetic stimulation of the pyramidal tract: the importance of coil orientation. *Clin Neurophysiol* **112**, 2312–9.

Gustafsson B, Wigstrom H, Abraham WC, HuangYY (1987) Long-Term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to the single volley synaptic potentials. *J Neurosci* **7**; 774-80.

H

Hallet M (2000). Transcranial magnetic stimulation and human brain. *Nature* **406**; 2271-7.

Hanajima R, Furubayashi T, Iwata NK, Shiio Y, Okabe S, Kanazawa I & Ugawa Y (2003). Further evidence to support different mechanisms underlying intracortical inhibition of the motor cortex. *Exp Brain Res* **151**, 427–34.

Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Enomoto H, Shiio Y, Mochizuki H, Furubayashi T, Uesugi H, Iwata NK & Kanazawa I. (2002). Mechanisms of intracortical I-wave facilitation elicited with paired-pulse magnetic stimulation in humans. *Journal of Physiology* **538**, 253–261

Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Sakai K, Furubayashi T, Machii K & Kanazawa I (1998a). Paired-pulse magnetic stimulation of the human motor cortex: differences among I waves. *J Physiol* **509**, 607–618.

Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Sakai K, Furubayashi T, Machii K, Uesugi H, Mochizuki H & Kanazawa I (1998b). Cortico-cortical inhibition of the motor cortical area projecting to sternocleidomastoid muscle in normals and patients with spasmodic torticollis or essential tremor. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **109**, 391-396.

Harris EW, Cotman CW (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fibre responses is not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett* **70**;132-7.

Haung YZ, Rothwell JC (2004). The effect of short-duration bursts of high- frequency, low-intensity transcranial magnetic stimulation on the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* **115**,1069-75.

Helmich RC, Bäumer T, Siebner HR, Bloem BR, Münchau A (2005) Hemispheric asymmetry and somatotopy of afferent inhibition in healthy humans. *Exp Brain Res* **167**; 211-9

Herring SW, Grimm AF & Grimm BR (1979). Functional heterogeneity in a multipinnate muscle. *Am J Anat* **154**, 563-576

Hess CW, Mills KR & Murray NMF (1987). Responses in small hand muscles from magnetic stimulation of the human brain. *J Physiol* **388**, 397–419.

Hicks R, Burke D, Stephen J, Woodforth I & Crawford M (1992). Corticospinal volleys evoked

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

by electrical stimulation of human motor cortex after withdrawal of volatile anaesthetics. *J Physiol* **456**, 393–404.

Hopf HC, Muller- Forell W & Hopf NJ (1992). Localization of emotional and volitional facial paresis. *Neurology* **42**, 1918-1923.

Hopf HC, Fitzek C, Marx J, et al. (2000). Emotional facial paresis of pontine origin. *Neurology* **54**;1217.

Hostelge G (1996). The somatic motor system. *Prog Brain Res* **107**;9-26.

Hostelge G (2002). Emotional innervation of the facial musculature. *Mov Disorder* **17**; S12-S16.

Hostelge G, Kuypers HGJM, Dekker JJ(1977). The organization of the bulbar fiber connections to the trigeminal, facial anhypoglossal nuclei II. An autoradiographic tracing study in cat. *Brain* **100**, 265-286.

Hwa GG & Avoli M (1992). Excitatory postsynaptic potentials recorded from regular-spiking cells in layers II/III of rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* **67**,728–37.

I

Ilic TV, Meintzschel F, Cleff U, Ruge D, Kessler KR & Ziemann U (2002). Short-interval paired-pulse inhibition and facilitation of human motor cortex: the dimension of stimulus intensity. *J Physiol* **545**, 153–167.

Inghilleri M, Berardelli A, Cruccu G, Priori A & Manfredi M (1989). Cortico-spinal potentials after transcranial stimulation in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **52**, 970–4.

Iwatsubo T, Kuzuhara S, Kanemitsu A, Shimada H & Toyokura Y (1990). Corticofugal projections to the motor nuclei of the brainstem and spinal cord in humans. *Neurology* **40**, 309–312.

Ito T, Ostry DJ (2010). Somatosensory contribution to motor learning due to facial skin deformation. *J Neurophysiol* **104** (3); 1230-8.

J

Jaberzadeh S, Pearce SL, Miles TS, Turker KS & Nordstrom MA (2007). Intracortical inhibition in the human trigeminal motor system. *Clin Neurophysiol* **118**, 1785-93

Jenny AB, Saper CB (1987). Organization of the facial and corticofacial projection in the monkey: A reconsideration of the upper motor neuron facial palsy, *Neurology* **27**(6);930-939.

Johansson RS, Trusson M, Olsson KA, Abbs JH (1988). Mechanoreceptors afferent activity in the infraorbital in man during speech and chewing movements, *Exp Brain Res* **72**(1); 209-214.

Jones EG (1983). The nature of the afferent pathways conveying short-latency inputs to primate motor cortex. In: Desmedt JE, ed. Motor control mechanisms in health and disease. Vol. 39.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

New York: Raven Press, 263–85.

K

Kaneko K, Kawai S, Fuchigami Y, Morita H & Ofuji A (1996a). The effect of current direction induced by transcranial magnetic stimulation on the corticospinal excitability in human brain. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **101**, 478–82.

Kaneko K, Kawai S, Fuchigami Y, Shiraishi G & Ito T (1996b). Effect of stimulus intensity and voluntary contraction on corticospinal potentials following transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci* **139**, 131–6.

Karnosh LJ (1945). Amimia or emotional paralysis of the face. *Diseases of the Nervous System* **6**; 106-108

Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* **1**;911-7

Kernell D & Chien-Ping WU (1967). Responses of the pyramidal tract to stimulation of the baboon's motor cortex. *J Physiol* **191**, 653–72.

Kimura J (1989). The blink reflex, in: *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve of the Nerve and Muscle: Principles and practice. (edition 2), F.A. Davis Company, ed. Philadelphia.*

Kitagawa H, Nakamura H, Kawaguchi Y, Tsuji H, Satone T, Takano H & Nakatoh S (1995). Magnetic-evoked compound muscle action potential neuromonitoring in spine surgery. *Spine* **20**, 2233–9.

Kobayashi M, Theoret H, Mottaghy FM, Gangitano M & Pascual-Leone A (2001). Intracortical inhibition and facilitation in human facial motor area: difference between upper and lower facial area. *Clin Neurophysiol* **112**, 1604–1611.

Kubo Y, Enomoto S & Nakamura Y (1981). Synaptic basis of orbital cortically induced rhythmical masticatory activity of trigeminal motoneurons in immobilized cats. *Brain Res* **230**, 97-110

Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P & Marsden CD (1993). Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* **471**, 501–519.

Kurth R, Villringer K, Curio G, Wolf KJ, Krause T, Repenthin J, et al. (2000). fMRI shows multiple somatotopic digit representation in human primary somatosensory cortex. *Neuroreport* **11**; 1487-1491.

Krause T, Kurth R, Ruben J, Schwiemann J, Villringer K, Deuchert M, et al. (2001). Representational overlap of adjacent fingers in multiple areas of human primary somatosensory cortex depends on electrical stimulus intensity: an fMRI study. *Brain Res* **899**;36-46.

Kuypers HGJM (1958). Corticobulbar connexions to the pons and lower brain-stem in man: an anatomical study. *Brain* **81**, 364-388.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Kwa SH, Korfage JA & Weijs WA (1995). Function-dependent anatomical parameters of rabbit masseter motor units. *J Dent Res* **74**, 1649-57

L

Lapatki BG, Stegeman DF, Jonas IE (2003) A surface EMG electrode for the simultaneous observation of multiple facial muscles. *Journales of Neuroscience Methods* **123**; 117-128.

Laplaine D, Talairach J, Meininger V et al. (1977). Clinical consequences of corticectomies involving the supplementary motor area in man. *J Neurol Sci* **34**; 301-314.

Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G et al. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* **89**; 684-90.

Lees AJ (1988). Facial mannerisms and tics. *Adv Neurol* **49**; 255-261.

Levy WB, Steward O (1979). Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brai Res* **175**; 233-45.

Lin LD, Murray GM & Sessle BJ (1993) The effect of bilateral cold block of the primate face primary somatosensory cortex on the performance of trained tongue-protrusion task and biting tasks. *J Neurophysiol* **70**, 985-996

Lin LD, Sesle BJ (1994). Functional properties of single neurons in face primary somatosensory cortex.III. Modulation of responses to peripheral stimuli during trained orofacial motor behaviors. *J Neurophysiol* **71**; 2401-2413.

Liscic RM, Zidar J(1998). Functional organisation of the facial motor system in man. *Coll Antropol* **22**;545-550.

Lovell M, Sutton D & Lindeman RC (1977). Muscle spindles in nonhuman primate extrinsic auricular muscles. *Anat Rec* **189**; 519-523.

Lund JP & Olsson KA (1983). The importance of reflexes and their control during jaw movement. *Trends Neurosci* **11**, 458-463

Lund JP (1991). Mastication and its control by the brainstem. *Crit Rev Oral Biol Med* **2**, 33-64

Lund JP, Kolta A, Westberg KG & Scott G (1998). Brainstem mechanisms underlying feeding behaviors. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 718-724

Luschei ES & Goldberg LJ (1981). Neural mechanisms of mandibular control: mastication and voluntary biting. In *The nervous system. Motor control, parts 1 and 2*. Handbook of physiology sect I, vol II. Mountcastle B (ed). pp 1237-1274. American Physiological Society,

Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* **305**;719-21.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

M

Macaluso GM, Pavesi G, Bonanini M, Mancina D & Gennari PU (1990). Motor-evoked potentials in masseter muscle by electrical and magnetic stimulation in intact alert man. *Arch Oral Biol* **35**, 623-628.

Malenka RC, Krauer JA, Zucker RS, Nicoll RA (1988) Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* **242**; 81-4.

Malgaroli A, Tsien RW (1992). Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* **357**;14-9.

Manabe T, Renner P, Nicoll RA (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**; 50-5.

Markram H; Lubke J, Frotscher M, Sakmann B (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* **275**; 213-5.

Matsumura M & Kubota K (1979). Cortical projections to hand-arm motor area from postarcuate area in macaque monkeys: a histological study of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci Lett* **11**, 241-6.

McCormick DA (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* **62**, 1018-27.

McCormick DA, Wang Z & Huguenard J (1993). Neurotransmitter control of neocortical neuronal activity and excitability. *Cereb Cortex* **3**, 387-98.

McMillan AS, Graven-Nielsen T, Romaniello A & Svensson P (2001). Motor potentials evoked by transcranial magnetic stimulation during isometric and dynamic masseter muscle contraction in humans. *Arch Oral Biol* **46**, 381-386.

McMillan AS, Watson C & Walshaw D (1998). Transcranial magnetic-stimulation mapping of the cortical topography of the human masseter muscle. *Arch Oral Biol* **43**, 925-931.

McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV (1978). Synaptic enhancement in fascia dentate: cooperativity among coactive afferents. *Brain Res* **157**; 277-93.

McNaughton BL (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentate act through different mechanisms. *J Physiol* **324**;249-62.

Meier-Ewert K, Gleitsmann K & Reiter F (1974). Acoustic jaw reflex in man: its relationship to other brainstem and microreflexes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **36**, 629-637.

Merton PA & Morton HB (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature* **285**, 227-231

Miles TS & Nordstrom MA (1995). Fatigue of jaw muscles and speech mechanisms. *Adv Exp*

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Med Biol **384**:415-26.

Mills KR & Kimiskidis V (1996). Cortical and spinal mechanisms of facilitation to brain stimulation. *Muscle Nerve* **19**, 953–958.

Mills KR & Nithi KA (1997). Corticomotor threshold to magnetic stimulation: normal values and repeatability. *Muscle and Nerve* **20**, 570-576.

Mills KR (1991). Magnetic brain stimulation: a tool to explore the action of the motor cortex on single human spinal motoneurons. *Trends Neurosci* **14**, 401–5.

Mills KR, Boniface SJ & Schubert M (1992). Magnetic brain stimulation with a double coil: the importance of coil orientation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**, 17–21.

Miralles R, Manns A, Nass X, Pasini C & Rocabado M (1987). Influence of protrusive functions on electromyographic activity of elevator muscles. *Cranio* **5**, 324-332

Monrad-Krohn GH (1924). On the dissociation of voluntary and emotional innervation in facial nerve paresis of central origin. *Brain* **124**; 22-35.

Morecraft RJ, Louise JL, Herrick JL & Stilwell- Morecraft KS (2001). Cortical innervation of the facial nucleus in the non-human primate: a new interpretation of the effects of stroke and related subtotal brain trauma on the muscles of facial expression. *Brain* **124**; 178-208.

Morecraft RJ, Cippolloni PB; Stilwell- Morecraft KS et al (2004). Cytoarchitecture and cortical connections of the posterior cingulate and adjacent somatosensory fields in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* **469**;37-69.

Morishita W, Marie H, Malenka RC (2005). Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nat Neurosci* **8**; 1043-50.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by a N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**; 774-6.

Mrachacz-Kresting N, Fong M, Murphy BA & Sinkjaer T (2007). Changes in excitability of the cortical projections to the human tibialis anterior following paired associative stimulation. *J Neurophysiol* **97**; 1951-1958.

Muakassa KF & Strick PL (1979). Frontal lobe inputs to primate motor cortex: evidence for four somatotopically organized 'premotor' areas. *Brain Res* **177**, 176–82.

Muellbacher W, Boroojerdi B, Ziemann U & Hallett M (2001a). Analogous corticocortical inhibition and facilitation in ipsilateral and contralateral human motor cortex representations of the tongue. *J Clin Neurophysiol* **18**, 550-558.

Muellbacher W, Ziemann U, Boroojerdi B, Cohen LG, Hallett M (2001b). Role of the human motor cortex in rapid motor learning. *Exp Brain Res* **136**; 431-438.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Muellbacher W, Ziemann U, Wissel J, Dang N, Kofler M, Facchini S, et al.(2002). Early consolidation in human primary motor cortex. *Nature* **415**; 640-4.

Murray GM, Lin LD, Moustafa EM & Sessle BJ (1991) Effects of reversible inactivation by cooling of the primate face motor cortex on the performance of a trained tongue-protrusion task and a trained biting task. *J Neurophysiol* **65**, 511–530

N

Nakamura H, Kitagawa H, Kawaguchi Y & Tsuji H (1996). Direct and indirect activation of human corticospinal neurons by transcranial magnetic and electrical stimulation. *Neurosci Lett* **210**, 45– 8

Nakamura H, Kitagawa H, Kawaguchi Y & Tsuji H (1997). Intracortical facilitation and inhibition after transcranial magnetic stimulation in conscious humans. *J Physiol* **498**, 817–23.

Nakamura Y & Katakura N (1995). Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci Res* **23**, 1–19.

Nakashima K, Thompson PD, Rothwell JC, Day BL, Stell R & Marsden CD (1989). An exteroceptive reflex in the sternocleidomastoid muscle produced by electrical stimulation of the supraorbital nerve in normal subjects and patients with spasmodic torticollis. *Neurology* **39**, 1354-1358.

Nicoll RA, Malenka RC (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **377**;115-8.

Nielsen JF (1997). Frequency-dependent conduction delay of motor-evoked potentials in multiple sclerosis. *Muscle Nerve* **20**, 1264-74.

Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo M-M, Kato K (2000). Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* **408**; 1090-8.

Nordin M, Hagdardh K.E., thomander L. & Wallin U (1986) Microelectrode recording from the facial nerve in man. *Acta Physiol Scand* **128**; 379-387.

Nordin M, Hagdardh K.E.(1989). Mechanoreceptive units in human infra-orbital nerve, *Acta Physiol Scand* **135**; 149-161.

Nordstrom MA (2007). Insights into the bilateral cortical control of human masticatory muscles revealed by transcranial magnetic stimulation. *Arch Oral Biol* **52**, 338-42.

Nordstrom MA, Miles TS, Gooden BR, Butler SL, Ridding MC & Thompson PD (1999). Motor cortical control of human masticatory muscles. In *Peripheral and spinal mechanisms in the neural control of movement*. Binder MD (ed) Prog Brain Res vol 123. Elsevier, pp 203-214

Nosten-Bertrand M, Errington ML, Murphy KP, Tokugawa Y, Barboni E, Kozlova E, et al. (1996) Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking thy-1. *Nature* **379**;826-9.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Nowark L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**;462-5.

O

Orth M, Snijders AH & Rothwell JC (2003). The variability of intracortical inhibition and facilitation. *Clin Neurophysiol* **114**, 2362–2369.

Ortu E, Deriu F, Suppa A, Giaconi E, Tolu E, Rothwell John C.(2008). Intracortical modulation of cortical-bulbar responses for the masseter muscle. *J Physiol* **586**; 3385-3404.

P

Paradiso OG, Cunic DI, Gunraj AC & Chen R (2005). Representation of facial muscles in human motor cortex. *J Physiol* **567**, 323–336.

Parvizi J, Anderson SW, Martin CO et al.(2001). Pathological laughter and crying: a link to the cerebellum. *Brain* **124**;1708-1719.

Patton HD & Amassian VE (1954). Single and multiple unit analysis of the cortical stage of pyramidal tract activation. *J Neurophysiol* **17**, 345–363

Patton HD & Amassian VE (1960). The pyramidal tract: its excitation and functions. In: The handbook of physiology. Vol. Sect. I, Vol. II. Washington, DC: American Physiology Society, 837– 61.

Paulus W, Classen J, Cohen LG, Large CH, Di Lazzaro, Nitsche M (2008). State of the art: pharmacologic effects on cortical excitability measures tested by transcranial magnetic stimulation. *Brain Stimulation* **1**; 151-163.

Pearce SL, Miles TS, Thompson PD & Nordstrom MA (2003). Responses of single motor units in human masseter to transcranial magnetic stimulation of either hemisphere. *J Physiol* **549**: 583–596

Penfield W & Boldrey E (1937). Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain* **60**, 389–443.

Penfield W & Rasmussen T (1950). The Cerebral Cortex of Man. *Macmillan New York*; 11-65.

Popelle RE (1993). The muscle spindle, in *Peripheral Neuropathy* (3rd edition), (vol1), D.J. Dyck and PK Thomas, eds, Philadelphia WB Saunders, 121-140.

Phillips CG (1987). Epicortical electrical mapping of motor areas in primates. In: Bock G, O'Connor M, Marsh J, eds. *Motor areas of the cerebral cortex*. London: John Wiley, 5–20.

Pong M, Hain KM, Gibson AR (2008) Pathway control of face and neck musculature by the basal ganglia and cerebellum. *Brain Res Rev* **58(2)**; 249-64.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Prior MM, Stinear JW (2006). Phasic spike-timing dependent plasticity of human motor cortex during walking. *Brain Research* **1110**; 150-158.

R

Reynolds C & Ashby P (1999). Inhibition in the human motor cortex is reduced just before a voluntary contraction. *Neurology* **53**, 730–735.

Ridding MC, Taylor JL & Rothwell JC (1995). The effect of voluntary contraction on cortico-cortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* **487**, 541–548.

Rinn WE (1984). The neuropsychology of facial expression : a review of the neurological and psychological mechanisms for producing facial expression. *Psychol Bul* **98**; 52-77.

Rizzolatti G , Luppino G, Matelli M (1998). The organization of the cortical motor system: new concepts. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **106**; 283-96.

Rodel R, Laskawi R & Markus H (1999). Transcranial cortical magnetic stimulation of lower-lip mimetic muscles: effect of coil position on motor evoked potentials. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **61**; 119-125.

Rodel R, Laskawi R & Markus H(2000). Motor Potentials of lower-lip mimetic muscles and distal arm muscles to the cortical transcranial magnetic stimulation: the possibility of one-dimensional separation of two cortical representation areas. *ORL* **62**;96-99.

Roick H, von Giesen HJ & Benecke R (1993). On the origin of the postexcitatory inhibition seen after transcranial magnetic brain stimulation in awake human subjects. *Exp Brain Res* **94**, 489–498.

Rona S, Berardelli A, Vacca L, Inghilleri M & Manfredi M (1998). Alterations of motor cortical inhibition in patients with dystonia. *Mov Disord* **13**, 118–124.

Rosenthal J, Waller HJ & Amassian VE (1967). An analysis of the activation of motor cortical neurons by surface stimulation. *J Neurophysiol* **30**, 844 –58.

Roshan L, Paradiso GO & Chen R (2003). Two phases of short-interval intracortical inhibition. *Exp Brain Res* **151**, 330–7.

Rosler KM, Hess CW, Heckmann R & Ludin HP (1989). Significance of shape and size of the stimulating coil in magnetic stimulation of the human motor cortex. *Neurosci Lett* **100**: 347–352

Ross RT, Mathiesen R (1998). Volitional and emotional supranuclear facial weakness. *N Engl J Med* **338**;1515.

Rossini PM, Barker AT, Berardelli A, Caramia MD, Caruso G, Cracco RQ, Dimitrijevic MR, Hallett M, Katayama Y, Lucking CH, Maertens de Noordhout AL, Marsden CD, Murray NMF, Rothwell JC, Swash M & Tomberg C (1994). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **91**, 79–92.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Rothwell J, Burke D, Hicks R, Stephen J, Woodforth I & Crawford M (1994). Transcranial electrical stimulation of the motor cortex in man: further evidence for the site of activation. *J Physiol* **481**, 243–50.

Rothwell JC, Hallett M, Berardelli A, Eisen A, Rossini P & Paulus W (1999). Magnetic stimulation: motor evoked potentials. The International federation of clinical neurophysiology. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* **52**, 97–103.

Rothwell JC, Thompson PD, Day BL, Boyd S & Marsden CD (1991). Stimulation of the human motor cortex through the scalp. *Exp Physiol* **76**: 159–200.

Ross RT, Mathiesen R(1998) –volitional and emotional supranuclear facial weakness. *N Engl J Med* **228**; 1515.

Roy FD & Gorassoni MA (2008). Effect of peripheral sensory input on excitability in the human leg motor cortex. *Proc Canadian Physiol Soc*; 23.

Roy FD, Norton JA, Gorassoni MA (2007). Role of sustained excitability of the leg motor cortex after transcranial magnetic stimulation in associative plasticity. *J Neurophysiol* **98**; 657-667.

Ruben J, Schweimann J, Deuchert M, Meyer R, Krause T, Curio G, et al. (2001) Somatotopic organization of human secondary somatosensory cortex. *Cereb cortex* **11**; 463-73

Rudiak D & Marg E (1994). Finding the depth of magnetic brain stimulation: a re-evaluation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **93**, 358–71.

S

Sackeim HA, Gur RC, Sucey MC (1978). Emotions are expressed more intensely on the left side of the face. *Science* **202**; 434-436.

Sakai K, Ugawa Y, Terao Y, Hanajima R, Furubayashi T & Kanazawa I (1997). Preferential activation of different I waves by transcranial magnetic stimulation with a figure-eight shaped coil. *Exp Brain Res* **113**, 24—32.

Sailer A, Molnar GF, Cunic DI & Chen R(2002). Effect of peripheral sensory input on cortical inhibition in humans. *J Physiol* **544**, 617-629.

Sanger TD, Garg RR & Chen R (2001). Interactions between two different inhibitory systems in the human motor cortex. *J Physiol* **530**, 307–317.

Schieber MH (2001). Constraints on somatotopic organization in the primary motor cortex. *J Neurophysiol* **86**; 2125-43.

Schwenkreis P, Liepert J, Witscher K, Fischer W, Weiller C, Malin J-P & Tegenthoff M (2000). Riluzole suppresses motor cortex facilitation in correlation to its plasma level. *Exp Brain Res* **135**, 293–9.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Schwenkreis P, Witscher K, Janssen F, Addo A, Dertwinkel R, Zenz M, Malin JP & Tegenthoff M (1999). Influence of the N-methyl-D-aspartate antagonist memantine on human motor cortex excitability. *Neurosci Lett* **270**, 137–40.

Skred KKR, Westgaard RH(1971). The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res* **35**;589-93.

Scutter SD & Turker KS (2001). The role of the muscle spindles in human masseter. *Hum Mov Sci* **20**, 489-497

Siebner HR, Dressnandt J, Auer C & Conrad B (1998). Continuous intrathecal baclofen infusions induced a marked increase of the transcranially evoked silent period in a patient with generalized dystonia. *Muscle Nerve* **21**, 1209–1212.

Sohn YH, Voller B, Dimyan M, StClair GA, Hanakawa T, Leo-Sarmiento FE, Jung HY, Hallett M (2004). Cortical control of voluntary blinking a transcranial magnetic stimulation study. *Clin Neurophysiol* **115**; 341-347.

Soto O, Valls-Sole´ J, Shanahan P & Rothwell J (2006). Reduction of intracortical inhibition in soleus muscle during postural activity. *J Neurophysiol* **96**, 1711–1717.

Sowman P.F, Flavel S.C., McShane C.L., Sakuma S., Miles T.S., Nordstrom M.A. (2009). Asymmetric Activation of motor cortex controlling Human Anterior Digastric muscles during speech and target-directed jaw movements. *J Neurophysiol* **102**, 159-166.

Stål P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE (1987). Enzyme- Hystochemical difference in fibre between the human major and minor zygomatic and the first dorsal interosseus muscle. *Arch Ord Biol* **32(11)**; 833-41.

Stål P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE(1990). Enzyme- Hystochemical and morphological characteristics of muscle fibres type in the human buccinators and orbicularis oris. *Arch oral Biol* **35(8)**; 449-58.

Stålberg E, Eriksson PO, Antoni L & Thornell LE (1986). Electrophysiological study of size and fibre distribution of motor units in the human masseter and temporal muscles. *Arch Oral Biol* **31**, 521-527

Stefan K, Kunesch E, Choen LG, Benecke R, Classen J (2000). Induction of plasticity in the human cortex by paired associative stimulation. *Brain* **123**; 572-84.

Stefan K, Wycislo M, Classen J(2004). Modulation of associative human motor cortical plasticity by attention. *J Neurophysiol* **92**;66-72.

Stefan K, wycislo M, Gentner R, Schramm A, Naumann M, Reiners K, et al. (2006). Temporary occlusion of associative motor cortical plasticity by prior dynamic motor training. *Cereb Cortex* **16**; 376-85.

Stinear JW, Hornby TG (2005). Stimulation-induced changes in lower limb corticomotor excitability during treadmill walking. *JPhysiol* **567.2**; 701-711.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Stokic DS, McKay WB, Scott L, Sherwood AM & Dimitrijevic MR (1997) Intracortical inhibition of lower limb motor-evoked potentials after paired transcranial magnetic stimulation. *Exp Brain Res* **117**, 437-443.

T

Takahashi T; Svoboda K, Malinow R (2003). Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. *Science* **299**;1585-8.

Tamburin S, Manganotti P, Zanette G, Fiaschi A (2001). Cutaneomotor integration in human hand motor areas: somatotopic effect and interaction of afferents. *Exp Brain Res* **141**; 232-41

Terao Y, Ugawa Y, Hanajima R, Machii K, Furubayashi T, Mochizuki H, Enomoto H, Shiio Y, Uesugi H, Iwata NK & Kanazawa I (2000). Predominant activation of I1-waves from the leg motor area by transcranial magnetic stimulation. *Brain Res* **859**, 137-146.

Tergau F, Wischer S & Paulus W (1999). Motor system excitability in patients with restless legs syndrome. *Neurology* **52**, 1060-1063.

Tokimura H, Ridding MC, Tokimura Y, Amassian VE & Rothwell JC (1996). Short latency facilitation between pairs of threshold magnetic stimuli applied to human motor cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **101**, 263-272.

Tokimura H, Di Lazzaro V, Tokimura Y, Oliviero A, Profice P, Insola A, Mazzone P, Tonali P & Rothwell JC (2000). Short latency inhibition of human hand motor cortex by somatosensory input from the hand. *J Physiol* **523**, 503-513.

Triggs WJ, Cros D, Macdonell RA, Chiappa KH, Fang J & Day BJ (1993b). Cortical and spinal motor excitability during the transcranial magnetic stimulation silent period in humans. *Brain Res* **628**, 39-48.

Triggs WJ, Kiers L, Cros D, Fang J & Chiappa KH (1993a). Facilitation of magnetic motor evoked potentials during the cortical stimulation silent period. *Neurology* **43**, 2615-20.

Triggs WJ, Ghacibeh G, Sringer U, Bowers D (2005). Lateralized asymmetry of facial Motor evoked potentials. *Neurol* **65**; 541-544.

Trompetto C, Caponnetto C, Buccolieri A, Marchese R & Abbruzzese G (1998). Responses of masseter muscles to transcranial magnetic stimulation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **109**, 309-314.

Trusson M, Johansson RS (2002). Orofacial mechanoreceptors in human: encoding characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behavioral Brain Res* **135**; 27-33.

Türk U, Rösier KM, Mathis J, Müllbacher W & Hess CW (1994). Assessment of motor pathways of masticatory muscles: an examination technique using electrical and magnetic stimulation. *Muscle Nerve*, **17**, 1271-1277

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Turker KS (2002). Reflex control of human jaw muscles. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 85-104

U

Uncini A, Treviso M, Di Muzio A, Simone P & Pullman S (1993). Physiological basis of voluntary activity inhibition induced by transcranial cortical stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **89**, 211-20.

Urban NN, Henze DA, Lewis DA, Barrionuevo G (1996). Properties of LTP induction in the CA3 region of the primate hippocampus. *Learn Mem* **3**; 86-95.

Urban PP, Wicht S, Fitzek S et al. (1999). Ipsilateral facial weakness in upper medullary infarction-sopranuclear or infranuclear origin? *J Neurol*. **246**; 798-801.

Urban PP, Wicht S, Marx J, et al. (1998). Isolated voluntary facial paresis due to pontine ischemia. *Neurology* **50**;1859-1862.

V

Valls-Sole J, Pascual-Leone A, Wassermann EM & Hallett M (1992). Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **85**, 355-364.

Valzania F, Strafella AP, Quatrone R, Santangelo M, Tropeani A, Lucchi D, Tassinari CA & De Grandis D (1997). Motor evoked responses to paired cortical magnetic stimulation in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **105**, 37-43.

Van Westen D, Fransson P, Olsrud J, Rosen B, Lundborg G, Larsson EM (2004). Fingersomatopy in area 3b: an fMRI-study. *BMC Neurosci* **5**, 28.

Van Willigen JD, Juch PJ, Ballintijn CM & Broekhuijsen ML (1986). A hierarchy of neural control of mastication in the rat. *Neuroscience* **19**, 447-455

Voss H (1956). Zahl und anordnung der Muskelspindeln in den oberen Zungenbein-muskeln, im M. trapezius und M. latissimus dorsi. *Anat Anz* **103**;443-446.

W

Wassermann EM, Samii A, Mercuri B, Ikoma K, Oddo D, Grill SE & Hallett M (1996). Responses to paired transcranial magnetic stimuli in resting, active, and recently activated muscles. *Exp Brain Res* **109**, 158-163.

Weddel RA, Miller JD, Trevarthen C, (1990). Voluntary emotional facial expression in patients with focal cerebral lesions. *Neuropsychologia* **28**; 49-60.

Weisskopf MG, Nicoll RA (1986). Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptors-mediated synaptic responses. *Nature* **376**;256-9.

Weijs WA, Juch PJW, Kwa SHS & Korff JAM (1993). Motor unit territories and fiber types in rabbit masseter muscle. *J Dent Res* **72**, 1491-1498

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Werhahn KJ, Fong JKY, Meyer BU, Priori A, Rothwell JC, Day BL & Thompson PD (1994). The effect of magnetic coil orientation on the latency of surface EMG and single motor unit responses in the first dorsal interosseous muscle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **93**, 138-146

Werhahn KJ, Kunesch E, Noachtar S, Benecke R & Classen J (1999). Differential effects on motorcortical inhibition induced by blockade of GABA uptake in humans. *J Physiol* **517**, 591-597.

Widmer CG, Klugman DK & English AW (1997). Anatomical partitioning and nerve branching patterns in the adult rabbit masseter. *Acta Anat* **159**, 222-232

Wigstrom H, Gustafsson B, Huang YY, Abraham WC (1986). Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol Scand* **126**; 317-9.

Wildgruber D, Ackermann H, Klose U, Kardatzki B, Grodd W (1996). Functional lateralization of speech production at primary motor cortex: a Fmri STUDY. *NeuroReport* **7**; 2791-2795.

Willoughby EW & Anderson NE (1984). Lower cranial nerve motor function in unilateral vascular lesions of the cerebral hemisphere. *Br Med J* **289**, 791-794

Wolters A, Sandbrink F, Schlottmann A, Kunesch E, Stefan K, Cohen LG, et al. (2003). A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J neurophysiol* **89**; 2339-45.

Y

Yildiz N, Yildiz S, Ertekin C, Aydogdu I, Uludag B (2004). Changes in the perioral muscle responses to cortical TMS induced by decrease of sensory input and electrical stimulation to the lower facial region. *Clin Neurophysiol* **115**; 2343-2349.

Yildiz S, Bademkiran F, Yildiz N, Aydogdu I, Uludag B, Ertekin C (2007). Facial motor cortex plasticity in patients with unilateral peripheral facial paralysis. *NeuroRehabilitation* **22**; 133-140.

Z

Zhang L, Kirschstein T, Sommersberg B, Merckens M, Manahan-Vaughan D, Elgersma Y, et al. (2005) Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* **25**; 7697-707.

Ziemann U & Rothwell JC (2000). I-waves in motor cortex. *J Clin Neurophysiol* **17**, 397-405.

Ziemann U (2004). TMS and drugs. *Clin Neurophysiol* **115**, 1717-1729.

Ziemann U, Chen R, Cohen LG & Hallett M (1998c). Dextromethorphan decreases the excitability of the human motor cortex. *Neurology* **51**, 1320-4.

Ziemann U, Lonnecker S & Paulus W (1995). Inhibition of human motor cortex by ethanol. A

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

transcranial magnetic stimulation study. *Brain* **118**, 1437–46.

Ziemann U, Lönnecker S, Steinhoff BJ & Paulus W (1996a) Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. *Ann Neurol* **40**, 367–378.

Ziemann U, Lönnecker S, Steinhoff BJ & Paulus W (1996b). The effect of lorazepam on the motor cortical excitability in man. *Exp Brain Res* **109**, 127–35.

Ziemann U, Netz J, Szelenyi A & Homberg V (1993). Spinal and supraspinal mechanisms contribute to the silent period in the contracting soleus muscle after transcranial magnetic stimulation of human motor cortex. *Neurosci Lett* **156**, 167-71.

Ziemann U, Rothwell JC & Ridding MC (1996c). Interaction between cortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *J Physiol* **496**, 873–881

Ziemann U, Tergau F, Wassermann EM, Wischer S, Hildebrandt J & Paulus W (1998a). Demonstration of facilitatory I-wave interaction in the human motor cortex by paired transcranial magnetic stimulation. *J Physiol* **511**, 181–190.

Ziemann U, Tergau F, Wischer S, Hildebrandt J & Paulus W (1998b). Pharmacological control of facilitatory I-wave interaction in the human motor cortex. A paired transcranial magnetic stimulation study. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **109**, 321–30.

Zoghi M, Pearce SL & Nordstrom MA (2003). Differential modulation of intracortical inhibition in human motor cortex during selective activation of an intrinsic hand muscle. *J Physiol* **550**, 933–946.

Pilurzi Giovanna

Proprietà fisiologiche della corteccia motoria facciale nell'uomo: Studio dei circuiti intracorticali facilitatori ed inibitori e modulazione della plasticità sinaptica

Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.