

**STUDIO fMRI DELL'OLFATTO. COMPONENTI PERCETTIVE E COGNITIVE
DELL'ELABORAZIONE CORTICALE DI QUATTRO AROMI FAMILIARI**

Settore scientifico-disciplinare BIO/09

RESPONSABILE DOTTORATO DI RICERCA

Chiar.mo Prof. Piero Paolo Battaglini

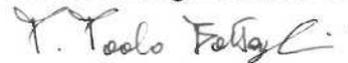


DOTTORANDA

Dr.ssa Laura Romoli

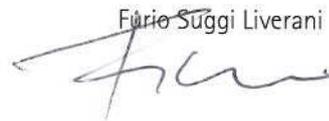
RELATORE

Chiar.mo Prof. Piero Paolo Battaglini
Università degli Studi di Trieste



CORRELATORE

Furio Suggi Liverani



ANNO ACCADEMICO 2009/2010

CAPITOLO 1

Premessa	Pag.5
Obiettivi	Pag.6
Interesse dello studio	Pag.7
Limiti dello studio	Pag.8

CAPITOLO 2

Introduzione	Pag.9
Il sistema olfattivo	Pag.9
Percezione e olfatto	Pag.10
<i>Detenzione</i>	Pag.10
<i>Riconoscimento</i>	Pag.11
Cognizione e olfatto	Pag.11
<i>Memoria e olfatto</i>	Pag.12
<i>Emozioni e olfatto</i>	Pag.14
<i>Linguaggio e olfatto</i>	Pag.15
<i>Edonismo e olfatto</i>	Pag.16
Tecnica	Pag.17
<i>Imaging cerebrale</i>	Pag.17

la risonanza magnetica funzionale Pag.18

L'effetto BOLD Pag.18

CAPITOLO 3

Materiali e metodi Pag.21

Soggetti Pag.21

Esame RM Pag.21

Olfattometro Pag.22

Stimoli Pag.23

Gli aromi utilizzati Pag.23

Aromi ecologici e trattati Pag.25

Paradigma sperimentale Pag.26

Software di analisi Pag.27

Timing di analisi Pag.31

CAPITOLO 4

Risultati Pag.32

Whole Brain Pag.32

Aromi ecologici <i>vs</i> trattati	Pag.39
Aromi trattati <i>vs</i> ecologici	Pag.41
During <i>vs</i> after e after <i>vs</i> during	Pag.43

CAPITOLO 5

Discussione	Pag.48
Appendice A	Pag.56
Ringraziamenti	Pag.59
Bibliografia	Pag.60

1. PREMESSA

L'olfatto, insieme al gusto, è il senso che maggiormente lega la specie umana con le altre specie animali. Olfatto e gusto hanno un forte valore evolutivo, sono sistemi d'allarme, fondamentali per la sopravvivenza dell'individuo e della specie. Quest'importanza evolutiva dipende dal fatto che sono in grado di estrarre informazioni chimiche dall'ambiente che permettono all'individuo di valutare eventuali rischi legati all'assunzione di cibi potenzialmente tossici o dannosi. Anatomicamente questo legame con le altre specie animali è evidenziato dal substrato anatomico sottostante i sensi chimici, ossia il sistema limbico, la parte filogeneticamente più arcaica dell'encefalo, da cui dipendono gli istinti, le emozioni e gli appetiti dell'essere umano e delle altre specie animali. Tuttavia, nella specie umana, i sensi chimici coinvolgono anche la parte filogeneticamente più recente dell'encefalo, ossia la corteccia prefrontale (orbito-frontale). Questa struttura corticale è alla base della potente risposta edonistica evocata da stimoli gustativi ed olfattivi.

Nonostante il coinvolgimento della parte più antica del cervello, a oggi, i sensi chimici sono i sensi meno compresi, specie a livello cognitivo. In parte, questa mancanza deriva dalla tradizione medico-scientifica, che ha privilegiato, nei secoli, lo studio di altre modalità sensoriali, in primis quella visiva. Fra i sensi speciali, l'olfatto è rimasto, ancor più del gusto, il senso più misterioso e negletto, rimanendo legato maggiormente alla curiosità e alla tradizione letteraria. Eppure, per vari motivi, lo studio dell'olfatto ha avuto un ruolo spesso volte cruciale nella ricerca neuroscientifica. Basti pensare che nei mammiferi l'olfatto propone il rapporto anatomico più stretto ed immediato fra recettore e corteccia cerebrale, e in un certo senso, quindi, tra cervello e mondo esterno. È il senso necessario per interpretare le segnalazioni dell'accoppiamento nel mondo animale (anche nella specie umana, seppur in misura minore e soprattutto inconsapevole in quanto, le molecole odorose sono rilasciate dalle femmine nella fase recettiva dell'estro e non sono segnali presenti anche in altri periodi come, invece, quelli visivi). L'olfatto, è un modello di informazione sensoriale direttamente integrata con il gusto che agisce sul comportamento prevalentemente attraverso processi non coscienti.

Negli ultimi decenni l'interesse per lo studio dell'olfatto si è risvegliato, ed ha, progressivamente, acquistato notorietà nello scenario scientifico, conclamato dall'assegnazione del premio Nobel nel 2004 a Richard Axel e Linda Buck per l'individuazione di una vasta famiglia di geni dei recettori dell'olfatto, definendone alcuni principi di fisiologia.

1.1 OBIETTIVI

Lo scopo del lavoro sperimentale descritto in questa tesi è lo studio dei processi percettivi, cognitivi e semantici dell'elaborazione olfattiva di quattro aromi familiari: agrumi, caffè, cioccolato e fiori.

I quattro aromi sono stati scelti come rappresentanti di categorie olfattive note, comuni e familiari in modo da poter equiparare a priori il grado di complessità semantica associata a ciascun aroma. Quest'aspetto è il cardine dello studio, in quanto, l'interesse alla base dell'esperimento è indagare come il cervello elabora non solo gli aspetti percettivi degli stimoli olfattivi, bensì anche le caratteristiche semantiche, cognitive ed edonistiche.

Nonostante le aumentate conoscenze specifiche, la comprensione di come il cervello umano elabori gli stimoli olfattivi rimane per gran parte un mistero, specie nelle ultime fasi di elaborazione corticali, ossia quando lo stimolo olfattivo raggiunge la corteccia prefrontale nota per la complessità delle funzioni cognitive da essa dipendenti, tra cui l'attribuzione di un giudizio edonistico, e di un'etichetta semantica descrivente lo stimolo. La scelta dei quattro aromi utilizzati deriva dalla necessità di categorizzare, in qualche modo, gli stimoli non essendo possibile, come per il gusto (senso speciale "fratello" dell'olfatto, in quanto anch'esso trasduce informazioni chimiche) individuare categorie basiche e principali. L'idea di scegliere il caffè, il cioccolato, l'agrumi e i fiori, deriva da una scelta basata su quello che può essere considerato un "immaginario collettivo", in cui a noi tutti gli stimoli scelti risultano familiari, conosciuti e riconoscibili (per lo meno nel mondo Occidentale); è difficile pensare che si possa crescere senza familiarizzare con gli aromi scelti.

I quattro aromi tuttavia, seppur equiparabili per familiarità, sono divisibili in due categorie e contraddistinti, ognuno, da peculiari caratteristiche.

Caffè e cioccolato, in questo lavoro, saranno considerati come aromi “*trattati*”, mentre agrumi e fiori come aromi “*ecologici*”. Tali definizioni verranno opportunamente spiegate (vedi Paragrafo Materiali e Metodi) al fine di non fuorviare il lettore sull’origine degli stessi.

Gli argomenti trattati in questa tesi possono essere riassunti da alcune domande cui si è cercato di rispondere attraverso uno studio di risonanza magnetica funzionale (fMRI):

- 1) Quali sono le attivazioni cerebrali comuni ai quattro aromi utilizzati?
- 2) E quali, invece, quelle peculiari di ciascun aroma?
- 3) Gli stimoli in questione, sono differenziabili nella tempistica di elaborazione (vedi Paragrafo Materiali e Metodi per la spiegazione del *timing*)?
- 4) Gli stimoli “ecologici” vengono elaborati dal cervello in modo caratterizzante rispetto agli stimoli “trattati” e viceversa?

1.2 INTERESSE DELLO STUDIO

Passando dalla pura fisiologia, che ha permesso di chiarire e spiegare i meccanismi alla base dei sistemi sensoriali, arrivando alle attuali neuroscienze cognitive, l’interesse scientifico per l’olfatto ha cambiato, o per lo meno aggiunto, punto di vista, portando con sé non solamente nuovi metodi d’indagine, ma, ciò che più conta, una maggiore complessità nell’indagare questi sistemi sensoriali, e nelle domande da porsi ancor prima di iniziare a studiarli con l’ausilio di complesse strumentazioni quali l’fMRI. Nascono così domande che non danno più importanza a cosa succede quando una molecola incontra il “suo recettore”, bensì a cosa accade dopo, al come e al quando il cervello umano integra le informazioni precedentemente codificate dai recettori e dalle varie stazioni di relè che s’incontrano lungo la via sensoriale dal momento in cui si avverte lo stimolo olfattivo, sino all’atto percettivo ed interpretativo della sostanza stessa.

1.3 LIMITI DELLO STUDIO

Il lavoro sperimentale oggetto di questa tesi vuole intendersi un lavoro preliminare, a carattere esplorativo, sullo studio delle componenti cognitive e semantiche dell'elaborazione di stimoli olfattivi noti. L'argomento trattato, infatti, racchiude in sé diverse difficoltà, e limitazioni, sia di carattere tecnico/pratico, che di carattere funzionale ed interpretativo, essendo, per quest'ultimo aspetto, la bibliografia in materia scarsa e non esaustiva, specie se paragonato alle conoscenze derivate da studi di neuroimaging per altri sistemi sensoriali, primo fra tutti il sistema visivo.

Proprio per questo motivo, le interpretazioni dei risultati ottenuti, presentati nelle discussioni, non hanno la pretesa di essere delle interpretazioni definitive, bensì delle riflessioni basate sulla conoscenza dei processi cerebrali dipendenti dalle aree attivate, rafforzate da risultati di studi di neuroimaging, e di essere, inoltre, delle riflessioni volte a suggerire delle ipotesi di lavoro da testare in futuro.

I quattro stimoli utilizzati, come spiegato nel corso della tesi, hanno caratteristiche semantiche e rappresentative peculiari, che possono essere alla base di attivazioni altrettanto peculiari, oltre alle attivazioni olfattive comuni. E proprio questo punto è l'interesse principale della tesi, ossia cercare di rispondere alle domande presentate precedentemente, focalizzandosi sul punto di vista dell'elaborazione cognitiva degli stimoli utilizzati.

Le difficoltà tecniche riguardano la somministrazione degli stimoli olfattivi. Non è di banale risoluzione come problema, specie in esperimenti di risonanza magnetica funzionale. Per poter iniziare e condurre lo studio, condizione ed attività indispensabile, è stata la progettazione del sistema di iniezione di aromi, l'olfattometro (vedi Materiali e Metodi ed Appendice A).

2. INTRODUZIONE

2.1 IL SISTEMA OLFATTIVO

Nei vertebrati minori le strutture olfattive occupano la maggior parte degli emisferi cerebrali, a conferma dell'importanza evolutiva di questo sistema sensoriale. Nell'uomo, invece, il sistema olfattivo ha dimensioni relativamente piccole, anche se comparato con il restante del sistema limbico. Il termine rinencefalo, letteralmente "cervello olfattivo", era utilizzato, in passato, per indicare diverse strutture limbiche, ma oggi viene ristretto a quelle strutture che nello specifico ricevono ed elaborano le afferenze olfattive, ossia il bulbo e il tratto olfattivo.

I neuroni recettori olfattivi, bipolari, situati nella mucosa olfattiva, sono attivati da molecole odorose e mandano assoni amielinici attraverso i nervi olfattori (I nervo cranico) raggiungendo il bulbo olfattivo in aree dette glomeruli. L'interazione tra le molecole odorose e i neuroni sensoriali olfattivi avviene sulle ciglia presenti sulla mucosa. Il legame delle molecole olfattive con i recettori attiva un processo di trasduzione metabotropico che porta alla produzione del potenziale d'azione. Dal lavoro di Linda B. Buck e Richard Axel, nel 1991, si è scoperto che non è possibile definire degli odori primari. Nel loro articolo fondamentale (Buck, L, Axel, R, 1991), infatti, hanno scoperto l'esistenza di una grande famiglia costituita da centinaia di geni che codificano per i recettori olfattivi.

Il bulbo olfattivo è parte del sistema nervoso centrale ed è situato nel solco olfattorio. Gli assoni di tutti i neuroni olfattivi che esprimono un particolare recettore olfattivo convergono su glomeruli anatomicamente separati; il bulbo olfattorio, quindi, è organizzato topograficamente, con singoli glomeruli che rappresentano un singolo tipo di recettore olfattivo. Gli assoni provenienti dai recettori olfattivi stabiliscono in ogni glomerulo sinapsi con i dendriti delle cellule mitriali e delle cellule a pennacchio. Questi due tipi di cellule sono i principali neuroni di secondo ordine del bulbo olfattivo ed escono dal bulbo decorrendo il tratto olfattivo fino a raggiungere la corteccia olfattiva. L'organizzazione topografica presente nel bulbo olfattivo non viene mantenuta a livello della corteccia, dove l'informazione viene integrata. La corteccia olfattiva riceve

proiezioni direttamente dal bulbo olfattivo; il sistema olfattivo è, infatti, l'unico sistema sensoriale che non ha connessioni primarie con il talamo. Le informazioni olfattive raggiungono prima la corteccia olfattiva primaria e successivamente il talamo che a propria volta le trasmette alla regione orbito frontale della corteccia cerebrale. Anche la corteccia olfattiva stessa proietta direttamente alla corteccia frontale. La corteccia olfattiva primaria è costituita da cinque aree anatomicamente distinte: il nucleo olfattivo anteriore, la corteccia piriforme, il tubercolo olfattivo, parte dell'amigdala e la corteccia entorinale. L'informazione olfattiva, inoltre, è trasmessa all'amigdala e all'ippocampo che mediano gli aspetti delle sensazioni olfattive legati alle emozioni e alla memoria.

La singolarità della trasmissione diretta dal bulbo olfattorio alla corteccia primaria, senza passare per il talamo, e la vasta rete di aree corticali coinvolte nell'elaborazione degli stimoli olfattivi sono il correlato anatomico della complessità cognitiva, emozionale e semantica dell'elaborazione corticale degli stimoli olfattivi che è l'argomento trattato in questo lavoro sperimentale.

2.2 PERCEZIONE E OLFATTO

In psicologia si distingue tra sensazione e percezione. Con sensazione s'intendono gli elementi della conoscenza sensibile, non ulteriormente scindibili, provocati da stimoli esterni agenti sugli organi di senso; la percezione, invece, è un processo più complesso, che, pur derivando dall'attività degli organi di senso, unifica una molteplicità di sensazioni, riferendole ad un oggetto distinto dal soggetto e dagli altri oggetti, formando ciò che viene definito percepito, ossia l'interpretazione del significato di uno stimolo sensoriale da parte del soggetto.

2.2.1 *Detenzione*

La sensazione può essere quindi definita come detenzione dello stimolo, in questo caso dello stimolo olfattivo che corrisponde, fisiologicamente, al momento in cui le molecole

odorose raggiungono l'epitelio olfattivo creando i legami con i recettori. Equivale al momento della trasduzione del segnale.

2.2.2 Riconoscimento

Il riconoscimento segue la detenzione. A livello fisiologico corrisponde al momento in cui il segnale raggiunge la corteccia cerebrale. In questo momento, lo stimolo si comporta come un input in grado di attivare uno o più nodi semantici che contengono l'informazione, sia enciclopedica che autobiografica, dello stimolo stesso, ossia ciò che compone la sua rappresentazione all'interno del nostro cervello. Qualsiasi stimolo sensoriale, infatti, è stato precedentemente esperito dal soggetto, creando nel substrato neuronale un engramma che contiene le caratteristiche percettive, semantiche dello stimolo in questione, nonché tutte le associazioni con le caratteristiche autobiografiche (ossia autocentrate al soggetto) ad esso legate. Nel momento del riconoscimento, in primis lo stimolo riceve un'etichetta semantica, poi tutta una serie di attributi che lo descrivono e caratterizzano.

Percezione e riconoscimento sono aspetti comuni a tutti e cinque i canali sensoriali. Da una parte hanno ruolo d'essere la nostra finestra sul mondo, con l'atto della detenzione, dall'altro caratterizzano quella che è la parte più singolare di ognuno di noi, ossia la memoria autobiografica.

L'olfatto, partendo dalla detenzione degli stimoli olfattivi, grazie alle caratteristiche anatomiche già evidenziate, gioca un ruolo fondamentale nel risvegliare connessioni sinaptiche deputate all'immagazzinamento e al controllo delle informazioni semantiche, mnesiche, emotive ed edonistiche.

2.3 COGNIZIONE E OLFATTO

Il termine cognizione si riferisce a quell'insieme di funzioni che permettono all'organismo di raccogliere, immagazzinare, valutare, trasformare le informazioni relative al proprio ambiente (percezione), al fine di utilizzarle per adattare il proprio

comportamento alle esigenze dell'ambiente o di modificare l'ambiente in funzione dei propri bisogni. Funzioni cognitive sono la memoria, il linguaggio, l'emozioni, il giudizio estetico/edonistico.

2.3.1 Memoria e olfatto

*“Quando di un antico passato non sussiste niente,
dopo la morte degli esseri, dopo la distruzione delle cose,
soli, più fragili ma più intensi, più immateriali, più persistenti, più fedeli,
l'odore e il sapore restano ancora a lungo,
come anime a ricordare, ad attendere, a sperare,
sulla rovina di tutto il resto, a reggere, senza piegarsi,
sulla loro gocciolina quasi impalpabile,
l'immenso edificio del ricordo.”*

Marcel Proust

L'olfatto è il senso privilegiato dalla memoria.

La tenacia dei ricordi olfattivi e la carica emotiva che li accompagna spiegano, meglio di ogni altra causa, la fortuna letteraria dell'olfatto e degli odori, denigrati da filosofi e scienziati, ma celebrati da scrittori quali Balzac, Baudelaire, Flaubert, Wilde, D'Annunzio, Proust, Gadda, Calvino. Ancorchè fuggevole e ineffabile, l'odore è, come dice Gaston Bachelard nella Poetica della Rêverie, quel “particolare immenso” (1960: 153) che in un istante ci guida al cuore delle cose, nelle intimità delle altre persone e nei recessi, spesso inconfessati, del nostro vissuto. Questo fenomeno, comune e speciale al tempo stesso, è noto come “sindrome di Proust”, perché, in una famosa pagina della “*À la recherche du temps perdu*”, lo scrittore evoca un episodio della sua infanzia legato al sapore e all'odore di un pezzetto di *madeleine* (1913:133). Gli odori attivano la memoria episodica. La memoria episodica è una sottocomponente della memoria a lungo termine. Nella sua prima formulazione Tulving (1972) ne sottolinea l'aspetto fondamentale, ossia che questi ricordi conservano le caratteristiche spazio-temporali del contesto iniziale. Un altro aspetto fondamentale della memoria episodica, o autobiografica, è che i ricordi sono

decisamente diretti al soggetto, inteso come attore, al più come osservatore. E' questa sottocomponente della memoria che maggiormente si lega alla nostra identità; il nostro senso di sé è legato a doppio filo con l'esperienza soggettiva del ricordo nel nostro passato. In stretto rapporto con la memoria autobiografica (cognitivamente parlando) e con il senso dell'olfatto (fisiologicamente parlando, considerato il substrato anatomico comune, il *sistema limbico*) è quella *emozionale*, componente del sistema che negli ultimi anni ha ottenuto un suo status di indipendenza. Senza le emozioni non c'è un'adeguata elaborazione delle informazioni apprese, e forse senza di esse, si può mettere in dubbio addirittura l'esistenza dell'apprendimento.

Le ricerche scientifiche degli ultimi decenni attestano singolarità cognitiva della memoria olfattiva evidenziandone la persistenza, la tonalità edonistica, il suo legame con il contesto percettivo e non ultimo la tendenza degli odori ad imporsi a prescindere dalla nostra attenzione volontaria. In uno studio fMRI di Gottfried et al. (2004) ad alcuni soggetti è stato chiesto di creare storie o di stabilire dei legami tra una serie di fotografie raffiguranti oggetti vari e una serie di odori diversi, percepiti contemporaneamente all'osservazione delle foto. La successiva elaborazione delle medesime foto, senza la diffusione degli odori, riattivava la corteccia olfattiva (corteccia piriforme). Questo dato induce a supporre che un ricordo episodico non venga immagazzinato in un unico centro cerebrale ma sia distribuito tra aree differenti, così da essere elicetabile anche da un unico canale sensoriale. Il canale olfattivo, inoltre, risulta particolarmente potente nell'innescare il recupero delle informazioni grazie alla sua spiccata componente emozionale. Questo aspetto della memoria olfattiva ci viene spiegato dall'anatomia: le informazioni olfattive sono elaborate in buona parte dal sistema limbico, ossia la struttura più arcaica del nostro encefalo, che controlla le emozioni, gli istinti e gli appetiti, in sinergia con la corteccia orbito frontale (che è la parte filogeneticamente più recente della corteccia cerebrale). Tutte queste aree integrano le diverse informazioni sensoriali e conferiscono all'odore una connotazione affettiva, favorendone la conservazione del ricordo.

2.3.2 *Emozioni e olfatto*

Nel vivere quotidiano è facilmente riscontrabile lo stretto legame tra olfatto ed emozioni, basti pensare a quanto forte può essere l'impatto emotivo di una fragranza che nella nostra memoria autobiografica associamo ad una persona cara. Basta anche una rapidissima esposizione a "quel" profumo per farci rivivere una serie di emozioni vissute con la persona a cui noi associamo la fragranza. Questo perché lo stimolo olfattivo funge da input che, con elevata forza evocativa, risveglia la memoria autobiografica associata allo stimolo in questione. Risveglia la memoria emotiva, sottocomponente della memoria autobiografica, a carattere soggettivo con connotazione spazio-temporale. Le Doux (1986) introduce il concetto di memoria emotiva, studiando i meccanismi alla base del condizionamento alla paura in animali da laboratorio, evidenziando l'importanza essenziale dell'amigdala e delle connessioni con il sistema limbico.

E' noto ormai da tempo il concetto di engramma (Hebb, D, 1949) ossia come un'informazione sia codificata e rappresentata nel cervello sottoforma di un nodo con numerose connessioni più o meno strette tra loro sia in senso cognitivo che in senso fisiologico se pensiamo alla "distanza" tra un'area cerebrale e l'altra. Gli input in entrata dal mondo esterno, catturati attraverso gli organi di senso, arrivano ad un engramma riattivandone la rappresentazione. Gli stimoli olfattivi risultano particolarmente potenti nello stimolare quei nodi emozionali collegati alla rappresentazione sottostante. La rapidità di questo flusso di informazioni è spiegato dalla fisiologia del sistema olfattivo. Come già sottolineato, infatti, il senso dell'olfatto è veicolato al cervello arcaico, lo stesso substrato cerebrale delle emozioni e degli appetiti.

Emozioni, olfatto e memoria autobiografica, sono dunque indissolubilmente legati dall'evoluzione cerebrale, condividendone il substrato anatomico.

2.3.3 Linguaggio e olfatto

“Cosa c’è in un nome?

Ciò che chiamiamo rosa, anche con un altro nome, conserva sempre il suo profumo.”

W. Shakespeare

Il linguaggio è la funzione cognitiva che caratterizza la specie umana. Nel momento in cui raggiungiamo consapevolezza di una sensazione provata, più o meno consciamente ne attribuiamo un’etichetta semantica. Tuttavia, la capacità di verbalizzare e descrivere uno stimolo olfattivo non è immediata, e il vocabolario semantico specifico è assai limitato rispetto alla varietà degli stimoli olfattivi. Anche la capacità di nominare gli odori con il loro nome non è così evidente; è sorprendente constatare il numero di persone che, sentendo l’essenza di aromi familiari ne riconoscono soltanto le memorie associate, senza essere capaci di nominarli. Tra i cinque sensi, l’olfatto è quello che ha meno legami con una visione mediata, ragionata del mondo. L’uomo razionalizza mediante il linguaggio; verbalizzare un’emozione è un atto che richiede un’abilità cognitiva appresa, non immediata, in quanto, nel momento in cui si verbalizza un’emozione in qualche modo se ne altera il suo stato. Questa difficoltà la si riscontra nel rapporto tra linguaggio e olfatto e questo dipende proprio dalla natura dell’olfatto, maggiormente legato, fisiologicamente e cognitivamente, alle emozioni piuttosto che alla razionalità. Mentre tutto ciò che percepiamo con il tatto o con la vista diventa per noi materiale sul quale riflettere per analizzare la realtà che ci circonda, le sensazioni olfattive spesso rimangono in noi solo a livello inconscio, ad un livello dove non avviene nessun processo di analisi razionale.

Se nella nostra quotidianità l’olfatto non è un mezzo di comunicazione esplicito, i profumi e gli odori che sentiamo diventano lo stesso, inevitabilmente, parte della nostra percezione del mondo. Proprio la natura inconsapevole del nostro odorare, fa sì, al contrario, che esso giochi un peso notevole nell’ambito delle emozioni. Lo sanno bene gli scrittori, che da sempre hanno dato il giusto peso a questo senso per accrescere il potenziale di significato veicolato nelle loro pagine. Un punto di vista assai interessante, e che verrà trattato nelle discussioni dei risultati, è uno dei principi fondamentali della poetica baudelairiana, quello della *sinestesia*, procedimento retorico che consiste

nell'associare, all'interno di un'unica immagine, sostantivi ed aggettivi appartenenti a sfere sensoriali diverse. Così, grazie ad un continuo richiamarsi delle sensazioni, un profumo può legarsi ad immagini ed esperienze vivide anche per gli altri sensi.

Ma questi aspetti linguistici e simbolici dell'olfatto, così enfatizzati nella letteratura, nelle credenze e nella storia, come possono venir spiegati dalla fisiologia?

Possibili spiegazioni per la disconnessione olfatto-linguaggio sono che:

1. le informazioni olfattive, a differenza delle altre modalità, non trasmettono al talamo che è un'importante area anche per il linguaggio;
2. molte delle analisi olfattive sono fatte dall'emisfero destro, ossia quello meno specializzato nel linguaggio e maggiormente nell'elaborazione delle emozioni;
3. possibile competizione tra elaborazioni olfattive e linguistiche;
4. l'olfatto, come precedentemente evidenziato, ha il substrato fisiologico nella parte più arcaica delle cervello, mentre il linguaggio nella parte filogeneticamente più recente, ossia la neocorteccia, specificamente nel lobo frontale che trova il suo massimo sviluppo nella specie umana. Questo può spiegare come, nel corso dell'evoluzione, la specie umana si è discostata sempre più dalla necessità di odorare l'ambiente, avendo sviluppato maggiormente altri sensi, mentre altre specie animali hanno privilegiato molto di più l'odorato.

2.3.4 *Edonismo e olfatto*

L'olfatto, insieme al gusto, estrae informazioni chimiche dall'ambiente circostante. Informazione importantissima e inseparabile dall'atto di ricercare il cibo ed alimentarsi, caratteristica che spiega l'importanza evolutiva dei sensi chimici. Tuttavia, grazie anche all'avvento di nuove tecniche d'indagine come l'fMRI, siamo oggi consapevoli della peculiare ed immediata valenza edonistica attribuibile ad una stimolazione olfattiva (ed anche gustativa), ossia quell'attimo di consapevolezza che avviene quando riconosciamo una sostanza, quando le attribuiamo un giudizio di piacevolezza o sgradevolezza; una sensazione frammista di ricordi, emozioni e caratteristiche della personalità di ognuno di noi (Castriota-Scaderbeg et al, 2005). L'olfatto gioca un ruolo chiave nell'apprezzamento del cibo, che non è più solo necessario per la sopravvivenza, bensì è diventato un atto

edonistico, volitivo. Un alimento è migliore se, oltre ad essere ben presentato, viene gustato in occasioni socialmente piacevoli, se riesce a soddisfare un desiderio. Il cibo è un esempio di piacere.

Tutti noi, ogni qual volta veniamo stimolati da una sostanza odorosa, ne attribuiamo una valutazione edonistica, perché per valutazione edonistica si intende l'attribuzione di un giudizio di piacevolezza, sia nella connotazione positiva che nella sua controparte (sgradevolezza). È impensabile, infatti, che una stimolazione olfattiva non riceva un attributo edonistico, più o meno consciamente. Spesse volte, inoltre, quest'attribuzione di significato è più potente per gli stimoli olfattivi rispetto alle altre modalità sensoriali, proprio per il legame del substrato anatomico del sistema olfattivo con il sistema limbico deputato al controllo delle emozioni. Le emozioni, così come un giudizio edonistico, difficilmente sono neutre, in quanto subiscono una valutazione immediata della loro connotazione positiva o negativa. Oggi, grazie soprattutto a studi di neuroimaging, sappiamo che gli aspetti edonistici dell'elaborazione di uno stimolo hanno il substrato anatomico nella corteccia prefrontale, più precisamente nella parte orbitofrontale.

2.4 TECNICA

2.4.1 *L'imaging cerebrale*

L'imaging cerebrale può essere generalmente definito come un insieme di tecniche grazie alle quali è possibile monitorare e definire l'attività cerebrale. Tecniche diverse sono sensibili a diversi tipi di attività cerebrali, passando dall'attività elettrica misurabile con l'ElettroEncefaloGramma (EEG), all'emodinamica, indagabile con tecniche come la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), la Tomografia ad Emissione di Fotone Singolo (SPECT) e la Risonanza Magnetica funzionale (fMRI). Tutte queste metodiche d'indagine permettono lo studio *in vivo* coinvolgendo il monitoraggio di larghe popolazioni di neuroni e/o aree cerebrali, anziché di singoli neuroni come nelle tecniche *in vitro*.

I metodi d'indagine utilizzati evidenziano i cambiamenti della dinamica cerebrale che rispecchiano le attività motorie, cognitive e sensoriali coinvolte nello specifico caso di studio e/o diagnostico.

Per lo svolgimento dell'esperimento oggetto di questa tesi è stata utilizzata la risonanza magnetica funzionale 1,5 Tesla (Philips), in collaborazione con il reparto di Radiologia dell'Ospedale Cattinara di Trieste.

2.4.2 *La risonanza magnetica funzionale*

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) è una tecnica che utilizza le proprietà magnetiche dei nuclei degli atomi costituenti la materia del nostro corpo. E' una tecnica non invasiva che fornisce un'elevata risoluzione spaziale nell'ordine di 1-2 mm. I segnali di risonanza delle molecole magnetizzabili vengono misurati mediante l'aiuto di campi magnetici e onde radio. Quando eseguiamo un compito (ad esempio il movimento di una mano, la lettura di una parola, o, come nel caso di questo studio, la percezione di un aroma) alcune aree cerebrali specifiche vengono reclutate per lo svolgimento del compito. Le aree che vengono reclutate nel compito sono quelle in cui viene bruciato più ossigeno. Di conseguenza varia il rapporto tra ossiemoglobina (HbO_2) e deossiemoglobina (Hbr) presenti nelle aree reclutate per l'attivazione. Tale variazione viene rilevata dal segnale di risonanza magnetica e tradotta in immagini utilizzabili in pratica grazie a specifici software di analisi delle immagini (*Statistical Parametric Mapping - SPM 5*). Queste aree, dal punto di vista del segnale di risonanza, sono caratterizzate dal cosiddetto effetto BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent).

2.4.3 *Effetto BOLD*

Capire l'effetto BOLD è importante per apprezzare gli aspetti e l'utilizzo dell'fMRI, incluse le limitazioni spaziali e temporali del mappaggio dell'attivazione cerebrale.

Nel caso dell'fMRI, la tecnica più applicata è quella che sfrutta un contrasto dipendente dal livello di ossigenazione del sangue, l'effetto BOLD.

Nello stato inattivo, le cellule nervose prelevano una certa quantità di ossigeno dall'emoglobina ossigenata (HbO_2), che quindi diventa emoglobina deossigenata (Hbr). Nello stato attivo, ossia quando il soggetto è sottoposto ad uno stimolo, come accade durante l'esperimento, la richiesta di ossigeno, da parte dei neuroni appartenenti all'area cerebrale coinvolta nel processamento del suddetto stimolo, aumenta e, conseguentemente, il flusso sanguigno porterà una quantità di emoglobina ossigenata maggiore rispetto allo stato inattivo. Nelle aree attivate dallo stimolo, quindi, ci sarà un aumento della concentrazione di ossiemoglobina. Quello che interessa ai fini dell'fMRI è che la deossi-Hb è paramagnetica, mentre la ossi-Hb è diamagnetica; quando uno o più neuroni sono attivi determinano una variazione del rapporto tra ossi e de-ossiemoglobina. L'effetto BOLD sfrutta le variazioni locali di concentrazione dell'emoglobina con le sue relative differenti proprietà magnetiche, a seconda dello stato in cui si trova. In pratica, un qualsiasi stimolo sensoriale, motorio o cognitivo, produce un aumento della concentrazione di emoglobina ossigenata. Parallelamente questo eccesso di emoglobina ossigenata inviata nelle regioni attivate, riduce la quantità di de-ossiemoglobina all'interno della zona di tessuto cerebrale interessato. La presenza di maggiori quantità di ossiemoglobina nei capillari genera microscopiche disomogeneità magnetiche con conseguente variazione del decadimento del segnale MR. Intensità maggiori del segnale BOLD derivano da diminuzioni della concentrazioni di emoglobina non ossigenata, dal momento che la suscettibilità magnetica del sangue risulta avere un valore più vicino a quello dei tessuti. Mediante analisi con scanner per immagini a risonanza magnetica è possibile stimare le variazioni del contrasto BOLD, che possono risultare di segno positivo o negativo in funzione delle variazioni relative del flusso sanguigno cerebrale e del consumo dell'ossigeno. Incrementi del flusso cerebrale sanguigno, in proporzione superiore all'aumento del consumo dell'ossigeno, porteranno ad un maggiore segnale BOLD; viceversa, diminuzione nel flusso causeranno minore intensità del segnale BOLD. La fMRI non produce immagini dirette di quello che avviene nel cervello, non solo perché queste immagini raffigurano un effetto indiretto (la risposta emodinamica) dell'attività neuronale (che è molto più rapida), ma, soprattutto perché, più che istantanee sono delle mappe di distribuzione statica di questo effetto su tutto il cervello.

Durante un tipico esperimento di fMRI, vengono acquisite immagini funzionali in assenza di stimoli che servono come immagini di confronto con le immagini acquisite durante la somministrazione dello stimolo d'interesse (in questo caso lo stimolo olfattivo). Lo stesso compito, inoltre, viene ripetuto periodicamente in modo da fare una media statistica di tutti i valori delle immagini relativi all'attivazione. L'immagine finale si ottiene facendo una sottrazione mediata tra l'immagine acquisita durante l'assenza di stimoli e l'immagine acquisita durante la presentazione dello stimolo. In questo modo si ottiene un'immagine statistica parametrica che viene poi sovrapposta all'immagine anatomica.

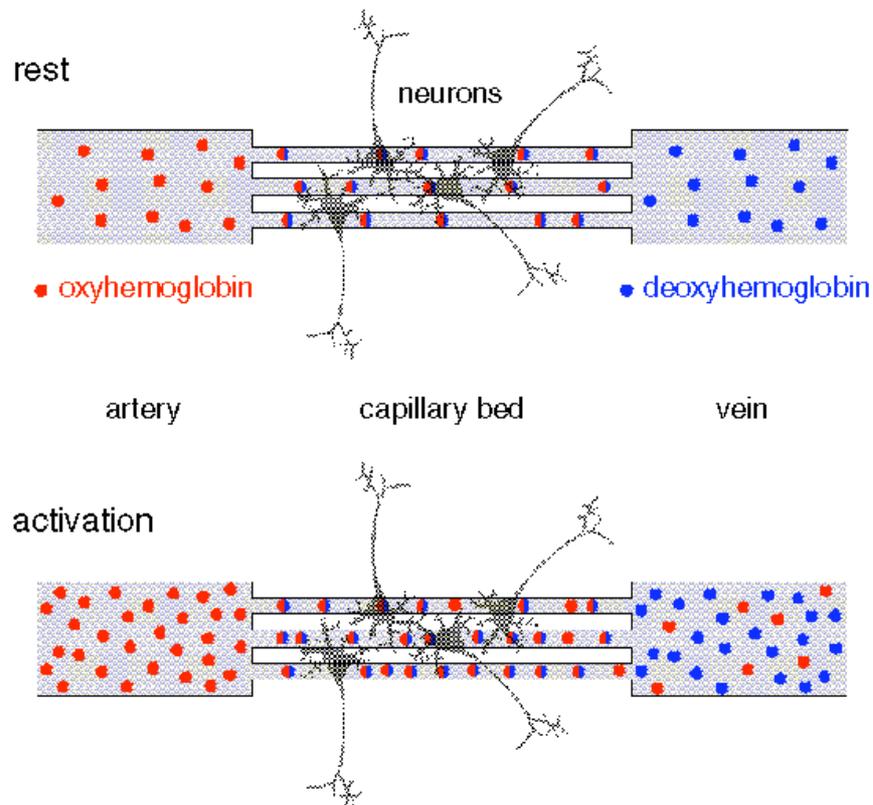


Fig. 1 stato basale (rest): flusso normale; livello basale [Hbr]; volume del sangue basale (CVB); segno MRI normale; stato attivato (activation): aumento del flusso; diminuzione di [Hbr]; aumento di CVB; aumento del segnale MRI.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SOGGETTI

Questo lavoro è stato condotto su un campione di 13 soggetti adulti sani, destrimani (età 26-43, media 34,9; 8 femmine, 5 maschi). Tutti i soggetti hanno riportato una storia clinica priva di malattie neurologiche e/o sensoriali e tutti hanno dichiarato di non assumere farmaci. Prima delle acquisizioni fMRI i partecipanti allo studio sono stati sottoposti al test di screening olfattivo “*The Brief Smell Identification Test*” (B-SIT, Doty, R. et al., 1996). Il B-SIT è una misura standardizzata che richiede l’identificazione di 12 odori comuni (micro-incapsulati in un cartoncino che rilascia l’aroma previo sfregamento della parte) selezionando il nome che si ritiene corretto tra una scelta di 4 alternative (scelta multipla forzata). Il punteggio è calcolato sul numero di risposte corrette ottenute, e confrontato con gli standard per sesso ed età.

Tutti i partecipanti allo studio hanno dato il consenso informato al trattamento dei loro dati al fine di questo studio e sono stati sottoposti al questionario preliminare alla Risonanza Magnetica.

3.2 ESAME RM

Le immagini e i dati prodotti in questa tesi sono stati ottenuti presso l’unità di Risonanza Magnetica dell’Ospedale di Cattinara; La strumentazione utilizzata è un magnete Philips Gyroscan Achieva (Philips, Best, the Netherlands) a 1,5 T.

Le specifiche delle sequenze funzionali applicati sono le seguenti:

- FOV: 210 x 210
- 25 slices da 4 mm di spessore
- gap: 0 mm
- TR: 2171
- TE: 45
- 288 dinamiche
- flip angle: 90°

- durata di acquisizione: 10:51 minuti
- voxel di acquisizione: 3.28/3.33/4
- voxel di ricostruzione: 3.28/3.28/4

3.3 OLFATTOMETRO

Uno dei principali limiti nello studio del senso speciale dell'olfatto utilizzando la risonanza magnetica funzionale è la modalità di somministrazione degli stimoli. Il soggetto, infatti, durante l'esperimento si trova sdraiato in posizione supina all'interno della macchina RM con le "bobine di superficie" (in questo caso, trattandosi di uno studio sulla funzionalità cerebrale, si posiziona il caschetto), al fine che tutto il corpo venga sottoposto all'azione del campo magnetico. La RM, inoltre, è situata in una stanza diagnostica che durante l'esecuzione dell'esame fMRI viene isolata dalle stanze comunicanti. Queste condizioni *sine qua non* della metodica stessa creano particolari difficoltà nella somministrazione di stimoli olfattivi che per loro caratteristica sono volatili. Un'altra variabile da monitorare nell'esecuzione di un esperimento di fMRI è che la somministrazione degli stimoli avvenga in misura controllata sia per quanto riguarda la quantità di stimolo somministrato al soggetto, sia nella tempistica di somministrazione.

Al fine di poter garantire un controllo nella tempistica e nella quantità degli stimoli olfattivi erogati, prima di iniziare lo studio oggetto di questa tesi, è stato assemblato un particolare dispositivo di erogazione di stimoli odorosi denominato *olfattometro*. Lo strumento è costituito da una circuiteria idraulica in cui gli stimoli sono intrappolati e viaggiano, in appositi tubicini, dallo strumento al naso del soggetto che si trova in RM, e da un software che garantisce l'apertura e la chiusura delle valvole che comandano l'erogazione degli stimoli (Vedi Appendice A). Lo strumento è stato costruito seguendo le linee guida e le specifiche di un gruppo di ricerca dell'Università di Harvard (Lowen, S et Lucas, S, 2006) che ha ideato, assemblato e divulgato le istruzioni per poter costruire un olfattometro finalizzato a studi fMRI a costi contenuti.

L'olfattometro è realizzato per poter somministrare fino a 4 stimoli odorosi, più lo stimolo neutro, costituito da aria, che funge sia da lavaggio tra uno stimolo e l'altro, sia da *baseline* nelle analisi di attivazione cerebrale.

3.4 STIMOLI

3.4.1 Gli aromi utilizzati: agrumi, caffè, cioccolato e fiori.

Gli stimoli utilizzati in questo studio sono i seguenti aromi: agrumi, caffè, cioccolato e fiori.

Tutti gli stimoli sono edibili, ad eccezione dei fiori. Sono differenziabili per caratteristiche di consumazione, per il grado/modo di familiarità (nel mondo Occidentale) e per gli attributi cognitivi/semantici che li descrivono.

Agrumi

Con il termine agrumi si intendono le piante appartenenti alla sottofamiglia *Aurantioideae* ed i loro frutti. Ne fanno parte i seguenti generi: Citrus: arancio, limone, pompelmo, mandarino, pomelo, cedro, clementina, bergamotto, chinotto, combava, limetta, arancio amaro, mandarancio, mapo, lipo, lice, pompia, limo.

Fortunella (Kumquat)

Poncirus trifoliata.

Gli agrumi, nelle loro varietà, vengono consumati prevalentemente freschi o in preparati quali bevande, canditi, marmellate e come aroma. Sono estremamente profumati, sia in natura che nelle varie preparazioni edibili e non. Gli agrumi sono spesso usati come nota aromatica nei profumi, nei prodotti per la cura della persona, e nelle profumazioni per ambienti. Da un punto di vista semantico/cognitivo sono fortemente legati alla caratteristica percettiva del colore; caratteristica dei frutti, infatti, è il colore giallo/arancio, che pur discostandosi nelle varie tonalità, si mantiene sempre all'interno della stessa famiglia di colore. Per capire quanto forte è questa caratteristica semantica, basti pensare al termine *arancio* che indica sia l'albero da frutto dell'agrume più diffuso al mondo, l'arancia, sia il nome del colore che è un tipico esempio di colore che in alcune

tradizioni non viene definito se non in associazione al colore di un elemento naturale (colore-materia).

Caffè

Stimolo edibile. Fortemente associato sia all'inconfondibile odore che al sapore. Consumato, generalmente, come bevanda, è anche ingrediente di numerose preparazioni dolciarie. È un gusto "adulto", poiché, generalmente, familiarizziamo molto prima con lo stimolo olfattivo piuttosto che con il gusto, essendo una bevanda che nella comune tradizione non viene consumata prima dell'adolescenza. A livello cognitivo/semantico viene associato ad un rituale (bere un caffè, pausa caffè, i caffè intesi come bar, per citare qualche esempio), al suo effetto di risvegliare la vigilanza/attenzione, nonché al tipico profumo del risveglio casalingo (l'aroma del caffè mattutino). Proprio per queste caratteristiche semantiche associate, l'aroma del caffè è, fra i quattro stimoli usati in questo studio, l'aroma più facilmente circoscrivibile ed identificabile, per il semplice motivo che nell'esperienza del singolo soggetto (memoria autobiografica) ognuno di noi è esposto almeno una volta al giorno, mediamente, allo stimolo olfattivo e/o gustativo in quanto, nella stragrande maggioranza dei casi, diviene un gesto quotidiano.

Cioccolato

Anche il cioccolato è uno stimolo edibile, generalmente, nell'immaginario comune, più associato al sapore rispetto che all'olfatto. Consumato sia in forma solida (tavoletta di cioccolata, cioccolatini etc), che come bevanda (che maggiormente stimola l'olfatto), nonché ingrediente fondamentale di numerosi prodotti dolciari. Gusto "bambino" nel senso che, nell'esperienza soggettiva si accomuna come uno dei primi, e forse più noto, stimolo piacevole/gratificante.

Fiori

Stimolo non edibile. L'aroma fiore è tra i quattro utilizzati, indubbiamente quello più difficilmente categorizzabile e di conseguenza con una rappresentazione semantica e cognitiva più vasta e variabile per ciascuno di noi.

Il profumo dei fiori, così come il loro colore sgargiante e la morfologia complessa, è un efficace stratagemma messo a punto dalle piante per attirare gli impollinatori. La fragranza dei fiori è specifica per ogni pianta e costituita da una miscela di piccole (100-250D) molecole volatili che appartengono per lo più a tre gruppi di composti: fenilpropanoidi/benzenoidi, terpenoidi e derivati degli acidi grassi. La concentrazione di ogni singolo composto è determinante: due fragranze diverse possono contenere concentrazioni diverse di composti uguali e uno stesso composto può avere un odore disgustoso ad elevata concentrazione e un profumo piacevole a concentrazioni molto più basse. L'elevata variabilità naturale delle fragranze floreali ne rende praticamente impossibile una restrizione e o categorizzazione. La variabilità è ulteriormente aumentata dall'utilizzo di fragranze floreali in prodotti di consumo quotidiani quali, ad esempio, prodotti per l'igiene e la cura della persona, profumi per ambienti, detersivi. Tale variabilità si riscontra anche a livello cognitivo, semantico ed immaginativo.

3.4.2 Aromi “ecologici” ed aromi “trattati”

Ecologici

In questa tesi, l'aroma agrumi e l'aroma fiori sono definiti come “ecologici” per sottolineare come, questi due stimoli, abbiano la loro caratteristica fragranza in natura, e come questa caratteristica sia una componente fondamentale delle rappresentazioni semantiche degli stessi. È, infatti, impossibile, svincolare la vista di un campo fiorito dalla percezione della fragranza, così come un agrumeto dal suo profumo.

Trattati

L'aroma caffè e il cioccolato, sono stati definiti “trattati” per sottolinearne la contrapposizione rispetto agli aromi agrumi e fiori. Caffè e cioccolato, infatti, nel nostro immaginario sono associati al loro tipico aroma di prodotti di consumo e non all'elemento naturale, ossia i semi di alcune specie di piccoli alberi tropicali appartenenti al genere *Coffea*, parte della famiglia botanica delle Rubiaceae, un gruppo di

angiosperme che comprende oltre 600 generi e 13.500 specie, per quanto riguarda il caffè e i semi della pianta del cacao, *Theobroma cacao* L, per quanto riguarda il cioccolato.

I semi di *Coffea Arabica* infatti, prima di poter sviluppare il caratteristico e intenso aroma che noi tutti associamo al caffè devono subire un processo produttivo piuttosto lungo ed elaborato, che parte dalla raccolta delle ciliegie di caffè nei paesi produttori della fascia tropicale. Le ciliegie subiranno poi un processo di essiccazione, pulitura, sbucciatura e selezione dei chicchi. Questi ultimi vengono confezionati in sacchi di juta e trasportati fino all'azienda di torrefazione che tosta i chicchi di caffè crudi, ottenendo un prodotto fruibile dal consumatore che sprigiona il caratteristico odore di caffè che noi tutti siamo abituati a percepire.

La produzione del cioccolato richiede un processo altrettanto complesso ed elaborato. I semi del cacao sono contenuti all'interno del frutto, definito cabossa, protetti da una polpa zuccherina. Una volta aperta la cabossa i semi e la polpa vanno incontro ad una fermentazione controllata, che permette di eliminare la polpa e bloccare la germinazione del seme. Dopo circa 5/6 giorni viene interrotta la fase di fermentazione e ridotta l'umidità mediante il processo di essiccazione.

La fase successiva è quella di tostatura, nella quale si sviluppano le caratteristiche sostanze aromatiche. Una volta torrefatte le fave di cacao vengono frantumate e macinate per ottenere la pasta di cacao. Quest'ultima subirà poi un processo di raffinazione, per ridurre ulteriormente la granulometria della massa di cacao, e di concaggio, per creare un'emulsione.

L'ultima fase nel processo di produzione del cioccolato è quella di temperaggio che serve a creare un reticolo di cristalli stabili all'interno del cioccolato. Il cacao, una volta temperato, viene inserito negli stampi per dar vita al prodotto finale, la tavoletta di cioccolato.

3.5 PARADIGMA SPERIMENTALE

Il paradigma sperimentale è un disegno a blocchi pseudo-randomizzato.

I quattro aromi sono somministrati tre volte. Ciascun aroma è intervallato dallo stimolo neutro (aria pura), che garantisce il lavaggio tra uno stimolo e l'altro e serve, inoltre,

come condizione di controllo *baseline* nella fase di analisi dei dati (il fatto che l'aria pura sia trattata come stimolo neutro con la stessa modalità di somministrazione e durata degli stimoli aromatici, garantisce di azzerare le attivazioni dovute al paradigma sperimentale (quali movimenti dovuti alla ricezione dello stimolo) essendo il neutro sottratto dalla condizione di interesse in fase di analisi). Di conseguenza ci sono 12 stimolazioni aromatiche intervallate dallo stimolo neutro (12) per ciascun blocco, con un totale di 24 stimolazioni. Ciascuna stimolazione dura 24 secondi, in cui nei primi due secondi l'aroma è rilasciato (vedi anche Appendice A). L'esperimento ha durata complessiva di 576 secondi, 9, 6 minuti.

Gli stimoli sono pseudo randomizzati in quanto si garantisce l'alternanza di ciascun stimolo aromatico con lo stimolo neutro, randomizzando la presentazione degli aromi (vedi Olfattometro e Appendice A).

Ciascun soggetto ha ripetuto l'esperimento 3 volte, intervallando le ripetizioni con delle pause di qualche minuto. In questo modo si sono ottenuti 39 blocchi di immagini funzionali, che sono state successivamente processate.

6 blocchi di immagini sono stati esclusi dalle analisi statistiche in quanto non conformi alle specifiche stabilite dopo le analisi di preprocessing (vedi Software di Analisi).

Le analisi statistiche sono state quindi effettuate su un totale di 33 blocchi di immagini.

3.6 SOFTWARE DI ANALISI

Tutte le immagini ottenute dal magnete in formato medico, DICOM, subiscono delle elaborazioni di pre-processing nel formato, da DICOM ad Analyze, e delle correzioni spazio-temporali necessarie alla successiva analisi statistica. Le immagini, in un primo step, sono state processate con il software MRICro, necessario per convertire le immagini dal formato medico all'Analyze compatibile con il software d'analisi SPM5 (Friston, K, *Wellcome Dept. of Cognitive Neurology, University College, London*).

SPM5:

Statistical Parametric Mapping (SPM), nella versione 5, è il software di analisi delle immagini funzionali di risonanza magnetica utilizzato in questa tesi. È un software

gratuito sviluppato nei primi anni '90 da Friston et al dell'University College di Londra. È il software più diffuso per le analisi di fMRI, e necessita dell'interfaccia di Matlab.

Prima di poter iniziare le analisi statistiche di primo e secondo livello, è necessario che tutte le immagini acquisite durante le scansioni fMRI subiscano dei processi (detti pre-processing) necessari per normalizzare temporalmente e spazialmente le immagini entro dei canoni generalmente accettati, al fine di poter garantire che le analisi statistiche siano effettuate su immagini valide da cui sono stati eliminati gli eventuali artefatti motori. Le immagini, in tal modo, possono venir lette dal sistema secondo i criteri e la normalizzazione MNI (Montral Neurological Institute); ciò significa che l'encefalo che si sta studiando viene adattato ad un template generale per necessità di uniformità dei risultati nel mondo scientifico. Il pre-processing consiste in un riallineamento temporale, uno spaziale, una normalizzazione su un template e uno smooth. Eseguiti questi processi, le immagini sono pronte al post-processing, ossia l'analisi statistica.

Analisi statistica: First Level

Grazie al preprocessing, le immagini sono riallineate nello spazio e nel tempo, normalizzate su un template comune e smoothate. È possibile, quindi, iniziare l'analisi statistica di primo livello, ovvero l'analisi intra-soggetto definendo per ciascun soggetto (e per ciascun blocco di immagini) la matrice sulla quale calcolare l'immagine, che successivamente viene stimata al fine di poter calcolare i contrasti (t-test) per le condizioni sperimentali specificate.

In questa tesi le condizioni specificate nella matrice sono 5: 1) neutro, 2) agrumi; 3) caffè; 4) cioccolato; 5) fiori.

Le condizioni vengono specificate nel sistema identificando i secondi in cui la condizione ha avuto inizio all'interno del paradigma sperimentale (blocco: sequenza di stimoli pseudo randomizzati). È molto importante, nel momento in cui ciascun soggetto esegue l'esperimento, prendere nota dell'esatta sequenza e tempistica di stimolazione; nel momento, infatti, in cui si genera la matrice, ciascun *onset* di ciascuno stimolo, per ogni presentazione dello stimolo (in questo caso 3 ripetizioni per ciascuno stimolo aromatico in ogni sequenza sperimentale e 12 stimoli neutri, quindi 3 onset per ogni stimolo e 12 onset per il neutro) dev'essere specificato. Si specifica, inoltre, la durata dell'intervallo di tempo che si vuole studiare; in questo caso 5 secondi.

La finalità dell'analisi di primo livello è quella di creare una matrice statistica che definisca la natura dell'ipotesi che si sta testando (per ciascun soggetto e per ciascuna ripetizione, in questo caso 3 ripetizioni per soggetto).

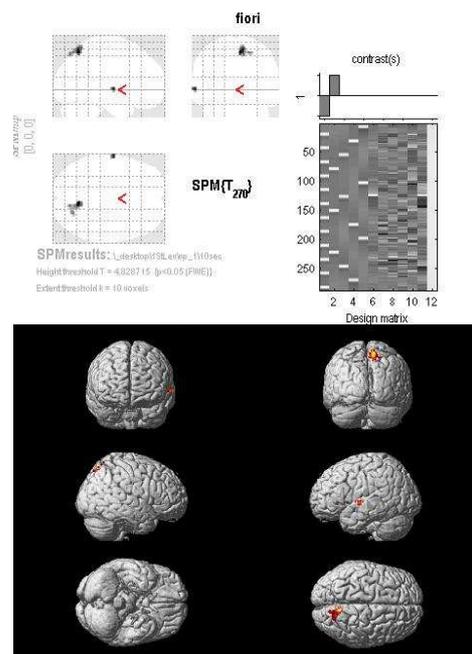


Fig. 2 esempio di matrice output SPM5 di primo livello (intra-soggetto). La matrice in alto a destra, si riferisce alle condizioni specificate; le prime 5 colonne si riferiscono alle condizioni (in questo caso gli aromi e lo stimolo neutro), mentre le righe corrispondono alle immagini funzionali (in questo studio 288 per sessione sperimentale). Nell'esempio il risultato riguarda il t-test specificato, ossia fiori vs neutro.

Si ottiene una matrice che definisce i possibili contrasti tra le condizioni inserite per ciascuna sessione sperimentale per ciascun soggetto. Nel caso di questo studio i soggetti sono 13, ciascuno ha ripetuto la sessione sperimentale 3 volte, ottenendo così un totale di 39 potenziali blocchi di immagini (ciascun blocco sperimentale costituito da 288 immagini funzionali) individualmente trattabili al primo livello (first level intra-soggetto).

Le immagini risultanti da ciascun t-test per ogni condizione, per ogni blocco d'immagini (quindi 39 blocchi di immagini) sono le immagini su cui può venir fatta l'analisi statistica di secondo livello. Il programma, infatti, genera delle immagini risultanti da ciascun t-test (come quella in Fig. 4) con un'estensione ".con" che verrà in seguito utilizzata come input per la generazione di una matrice di secondo livello su cui vengono fatte ulteriori analisi statistiche e da cui escono i risultati conclusivi trattati nella Discussione.

Analisi statistica: Second Level -Full Factorial-

Le immagini ".con" output del *First Level*, divengono l'input per la creazione della matrice nel *Second Level*.

Anche nel secondo livello, bisogna disegnare una matrice; questa volta l'analisi esce dal singolo soggetto per analizzare tutti i soggetti dell'analisi e le relazioni esistenti in un'analisi inter-gruppo (in questo caso è stata eseguita un'analisi ANOVA Full Factorial). Le immagini output del primo livello (.con) vengono usate come dati grezzi per disegnare la matrice. A tal fine bisogna: 1) creare un nuovo fattore specificandone il numero di livelli e assegnando un nome per ciascuno; 2) ad ogni livello corrispondono determinate immagini con estensione .con che devono venir inserire al fine di ottenere la matrice desiderata.

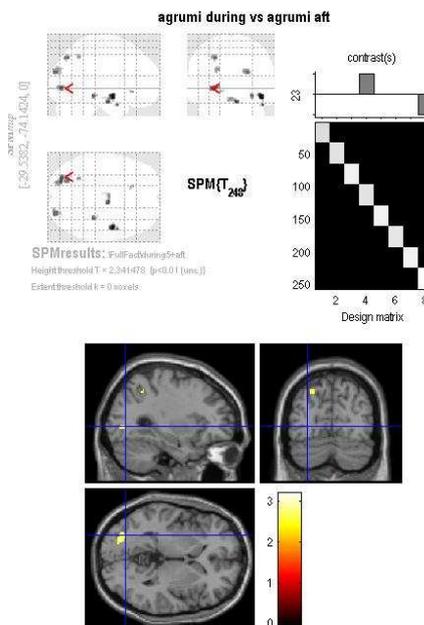


Fig. 3 esempio di matrice output SPM5 di Secondo Livello (Full-Factorial). La matrice in alto a destra, si riferisce alle condizioni specificate; le prime 4 colonne si riferiscono ai 4 aromi nella fase *During*, le colonne dalla quinta all'ultima corrispondono ai 4 aromi nella fase *After*. Nell'esempio il risultato riguarda il t-test specificato, ossia agrumi during vs agrumi after.

3.7 TIMING D'ANALISI

Le analisi statistiche, di primo e di secondo livello, effettuate con SPM5 sono state condotte su due diversi intervalli temporali definiti “*during*” ed “*after*”.

During: copre l'intervallo di tempo di 5 secondi durante il quale il soggetto riceve l'iniezione di aroma (vedi paradigma) della durata di 2 secondi, e i 3 secondi di elaborazione, immediatamente successiva, dello stimolo.

After: si riferisce all'intervallo di tempo costituito dai 5 secondi successivi, in cui al soggetto non è chiesto di fare nulla né riceve stimoli. Corrisponde all'elaborazione dello stimolo aromatico ricevuto nei secondi precedenti.

La differenziazione temporale è stata effettuata al fine di indagare possibili differenze qualitative e/o quantitative di attivazione cerebrale in due momenti diversi di elaborazione dello stimolo, ritenendo il periodo *during* corrispondente al livello percettivo ed il periodo *after* al livello cognitivo/semantico/edonistico.

4. RISULTATI

4.1 WHOLE BRAIN

Le attivazioni cerebrali presentate in questo paragrafo corrispondono all'output di SPM5 del secondo livello d'analisi, ossia del Full Factorial (vedi Paragrafo Software d'analisi in Materiali e Metodi). Sono, quindi, le aree d'attivazione ($p < 0.01$) presentate per stimolo rispettivamente nel periodo during e in quello after, senza restrizioni d'area d'interesse, ossia considerando l'intero cervello (Whole Brain).

Agrumi

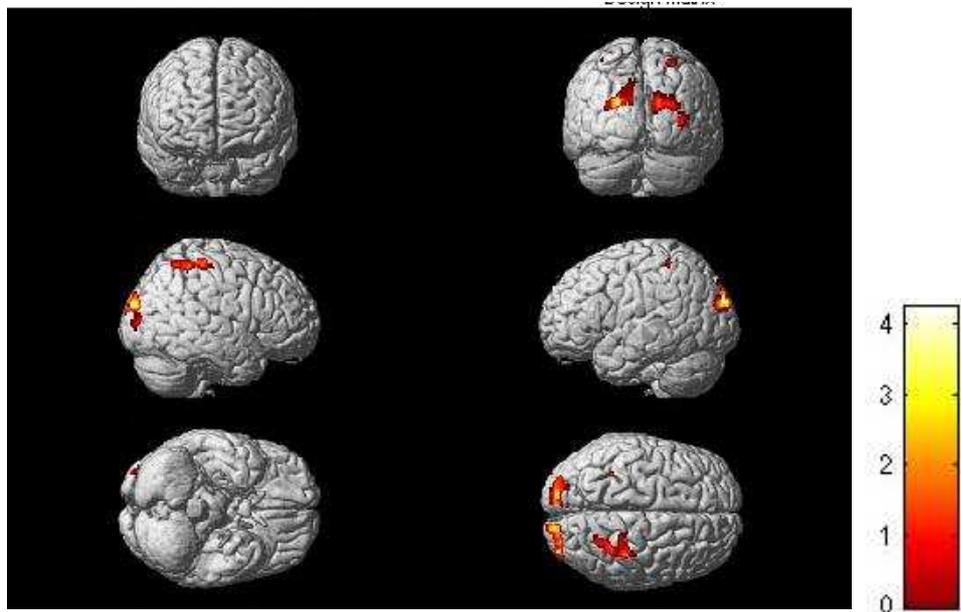


Fig. 4 studio intragruppo *Agrumi During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
16, 100, 29	destro	243	18, 17	Giro occipitale superiore
36, -98, 9	destro	66	12	Giro occipitale mediale
-20, -98, 29	sinistro	316	18	Giro occipitale superiore
-34, -48, 67	sinistro	20	2, 1	Giro postcentrale

Tab. 1 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Agrumi-During*.

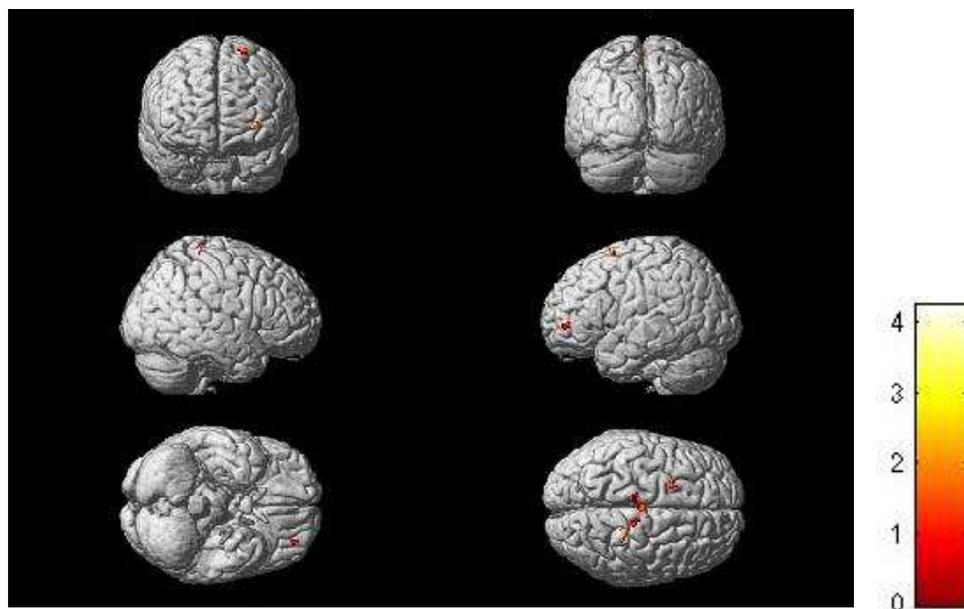


Fig. 5 studio intragruppo *Agrumi After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
12, -32, 61	destro	40	4	SMA
26, -40 75	destro	30	6, 1, 3b	Giro postcentrale
-22, 6, 75	sinistro	27	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-32, 44, 7	sinistro	23	9, 10, 46	Giro frontale mediale
0, -22, 69	sinistro	19	6	Lobulo paracentrale

Tab. 2 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Agrumi-After*.

Caffè

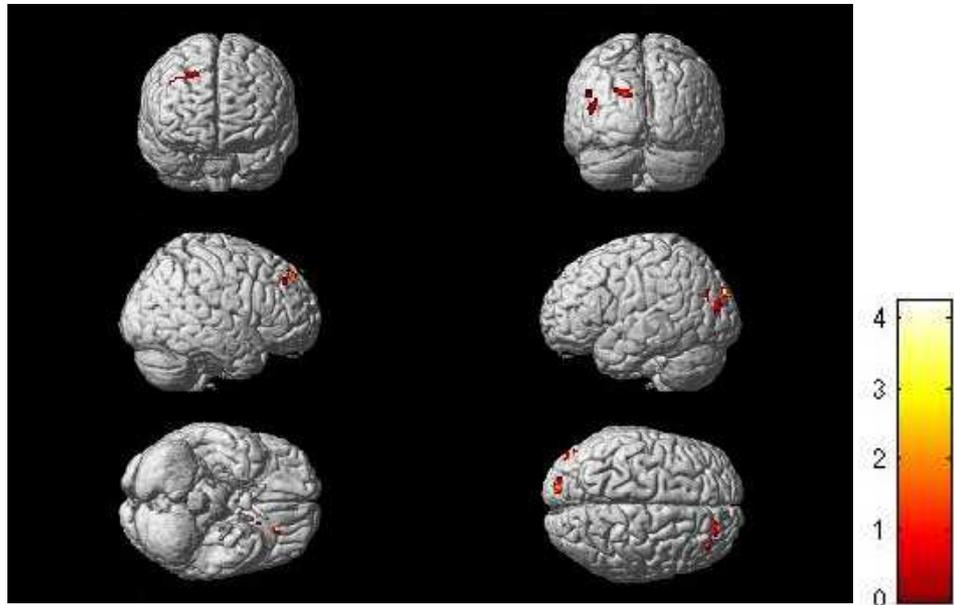


Fig. 6 studio intragruppo *Caffè During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
6, -36, 47	destro	92	24, 32, 33	Corteccia cingolata mediale
28, 42, -7	destro	88	11	Giro orbitale mediale
-24, 32, -5	sinistro	27	47	Giro frontale inferiore p.orbit.
-12, 2, 17	sinistro	40	/	Nucleo caudato

Tab.3 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Caffè-During*.

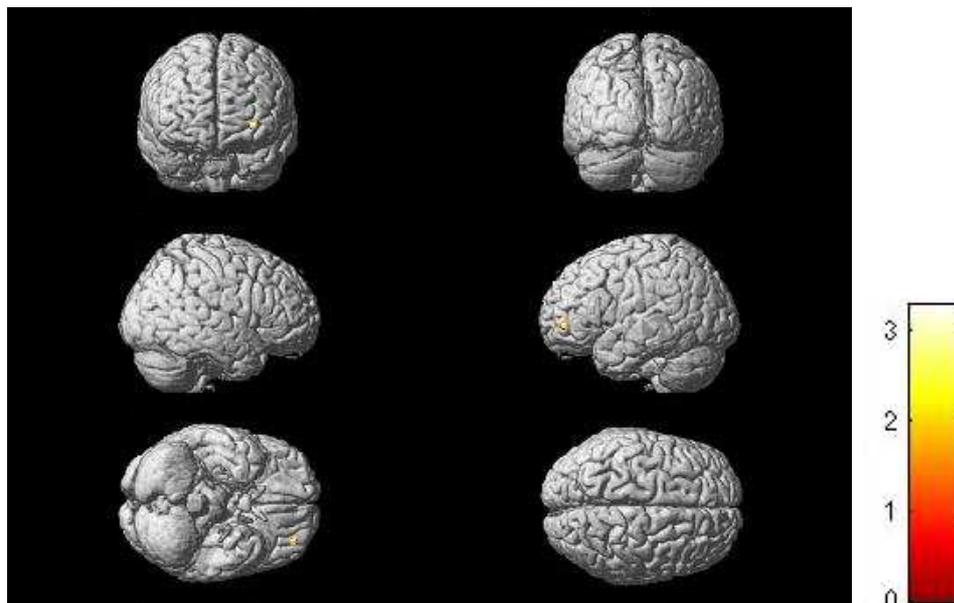


Fig. 7 studio intragruppo *Caffè After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
-32, 46, 5	sinistro	28	9, 10, 46	Giro frontale mediale

Tab.4 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Caffè-After*.

Cioccolato

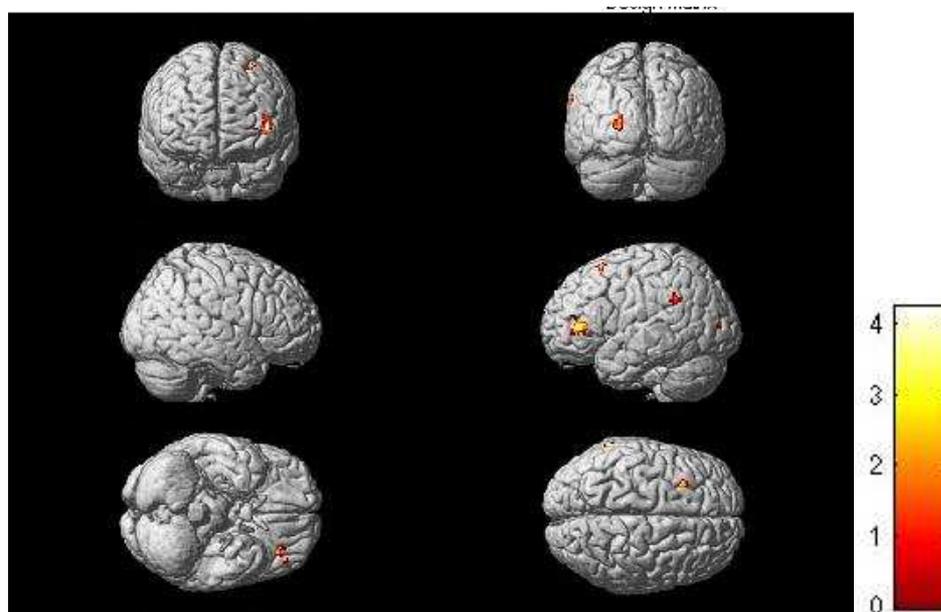


Fig. 8 studio intragruppo *Cioccolato During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
2, -64, -3	destro	33	/	Cervelletto, lobulo V
30, -56, 11	destro	122	17, 18	Giro calcarino
-44, 36, 11	sinistro	207	45	Giro frontale inferiore p.triang.
-30, 14, 67	sinistro	28	9, 10, 46	Giro frontale mediale

Tab.5 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Cioccolato-During*.

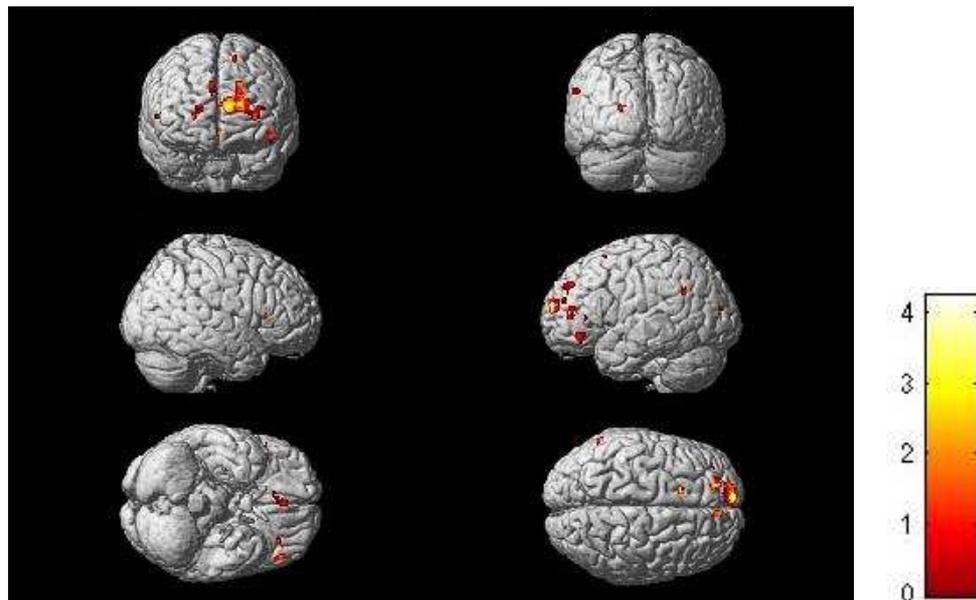


Fig. 9 studio intragruppo *Cioccolato After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
2, 36, -1	destro	246	11	Giro orbitale mediale
6, 44, 39	destro	30	8, 9	Giro mediale superiore
-20, 42, 25	sinistro	568	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-14, 12, 63	sinistro	38	6	Giro frontale superiore
-46, 34, -7	sinistro	36	47	Giro frontale inferiore p.orbit.

Tab. 6 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Cioccolato-After*.

Fiori

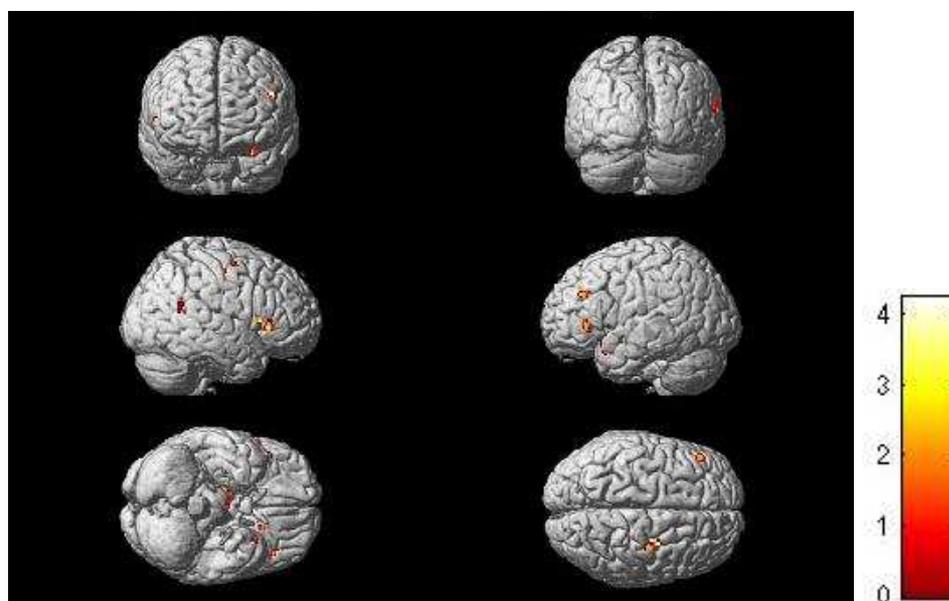


Fig. 10 studio intragruppo *Fiori During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
26, -36, 49	destro	70	3a	Giro postcentrale
28, -12, 49	destro	207	6	SMA
12, -26, 41	destro	68	24, 32, 33	Corteccia cingolata mediale
46, 22, 5	destro	31	45	Giro frontale inferiore p.triang.
64, -58, 21	destro	11	27, 28, 34, 35, 36	Giro temporale mediale
56, 14, 13	destro	14	44, 45	Giro frontale inferiore p.operc.
-38, 28, 9	sinistro	37	45	Giro frontale inferiore p.triang.
-48, 30, 35	sinistro	68	9, 10, 46	Giro frontale mediale
-30, 10, -17	sinistro	40	47	Giro frontale inferiore p.orbit.
-8, -2, 35	sinistro	13	24, 32, 33	Corteccia cingolata anteriore
-34, 12, 11	sinistro	16	44	Insula lobare

Tab.7 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Fiori-During*.

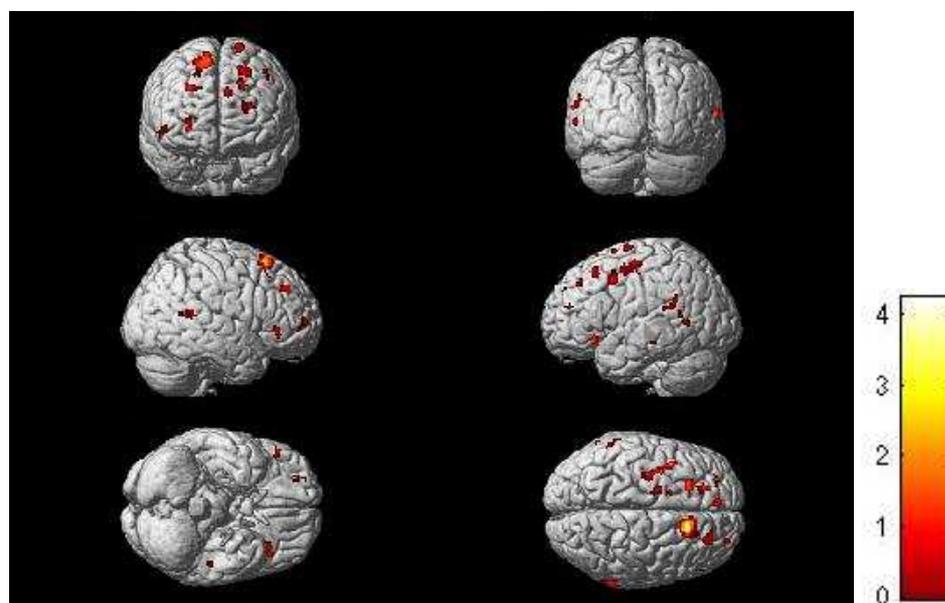


Fig. 11 studio intragruppo *Fiori After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
18, 20, 47	destro	444	4, 6, 8	Giro frontale superiore
66, -50, 19	destro	38	38, 22	Giro temporale superiore
28, 54, 9	destro	72	9, 10	Giro frontale mediale
-2, 18, 25	sinistro	80	24, 32, 33	Corteccia cingolata anteriore
-22, 40, 25	sinistro	444	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-40, 22, -5	sinistro	63	47	Giro frontale inferiore p.orbit.
-6, 44, 37	sinistro	39	9	Giro mediale superiore
-20, 20, 55	sinistro	94	9, 10	Giro frontale mediale
-40, 2, 49	sinistro	72	44	Giro precentrale

Tab. 8 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Fiori-After*.

4.2 AROMI “ECOLOGICI” vs AROMI “TRATTATI”

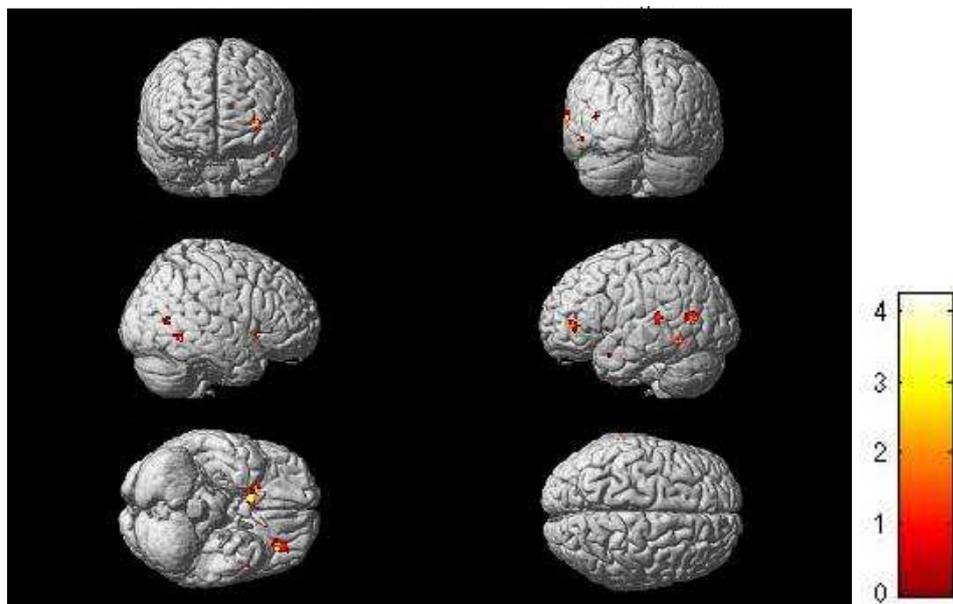


Fig. 12 studio intragruppo *Ecologici vs Trattati-During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
56, 12, 13	destro	425	44	Giro frontale inferiore p.operc.
44, 6, -5	destro	325	44	Insula lobare
36, -34, 65	destro	1425	4a, 1, 6	Giro postcentrale
4, 58, 33	destro	39	9	Giro mediale superiore
58, -38, 47	destro	425	40	Giro sopramarginale
-4, 16, -1	sinistro	68	34, 35, 36	Corteccia olfattiva
-34, 42, 37	sinistro	96	9, 10	Giro frontale mediale

Tab. 9 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Ecologici vs Trattati-During*.

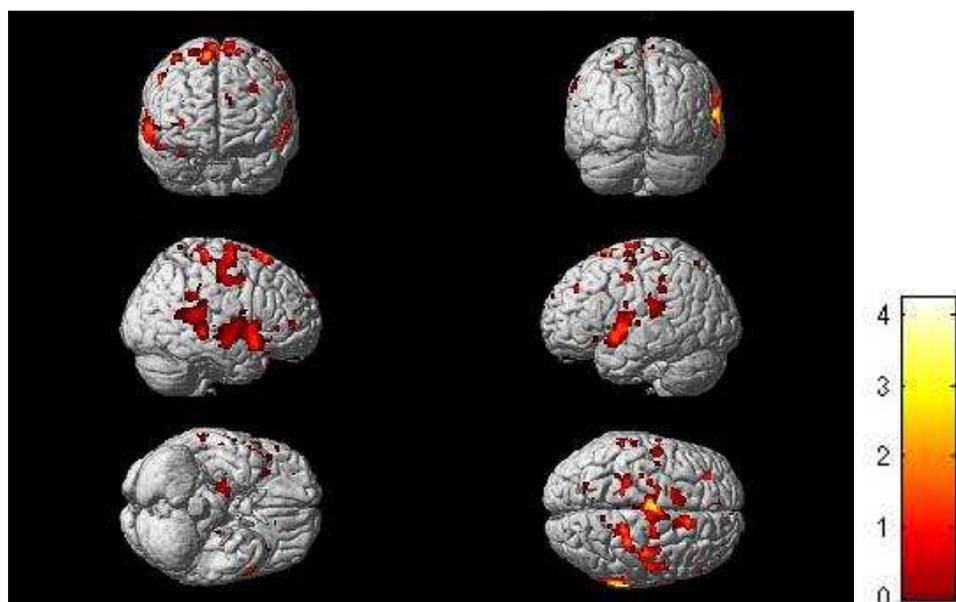


Fig. 13 studio intragruppo *Ecologici vs Trattati-After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
56, 8, -5	destro	659	38	Polo temporale
10, 18, 71	destro	182	6	SMA
20, -20, -13	destro	113	20	Giro paraippocampale
18, -38, 69	destro	706	4, 3, 1, 6	Giro postcentrale
12, -18, 51	destro	146	23, 26, 29, 30, 31	Corteccia cingolata
-54, 2, -5	sinistro	500	38	Polo temporale
-14, 6, 75	sinistro	107	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-10, -14, 81	sinistro	649	6	SMA

Tab. 10 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Ecologici vs Trattati-After*.

4.3 AROMI “TRATTATTI” vs AROMI “ECOLOGICI”

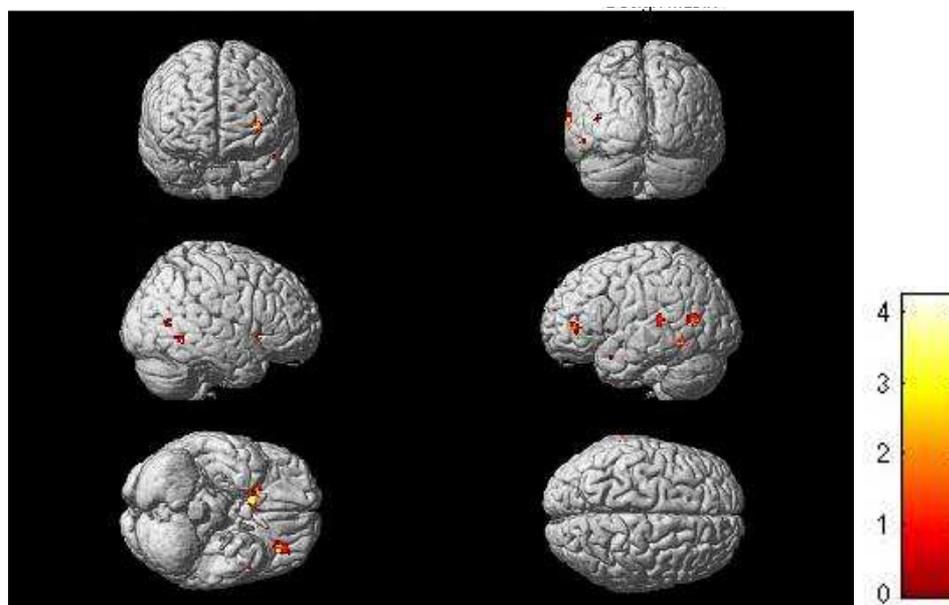


Fig. 14 studio intragruppo *Trattati vs Ecologici-During*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
20, 10, -3	destro	211	/	Putamen
-38, -66, 15	sinistro	85	40	Corteccia parietale inferiore
-20, 0, 27	sinistro	130	/	Nucleo caudato
-66, -38, 15	sinistro	32	22	Giro temporale superiore
-52, -56, 15	sinistro	23	21	Giro temporale mediale
-32, -66, 37	sinistro	11	18	Giro occipitale mediale
-40, 34, 17	sinistro	10	45	Giro frontale inferiore p.triang.
-10, -36, -7	sinistro	24	/	Cervelletto, lobi I-IV

Tab. 11 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Trattati vs Ecologici-During*.

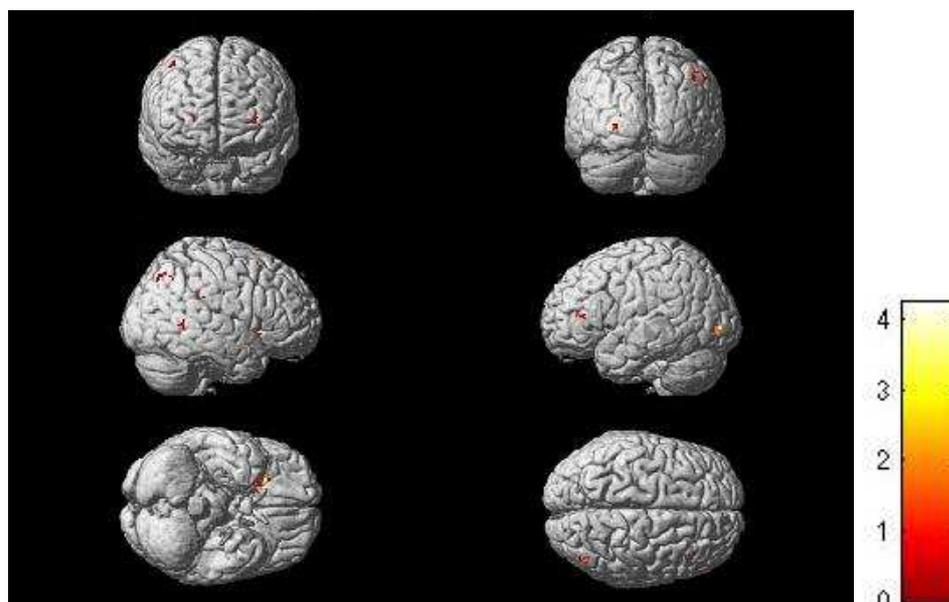


Fig. 15 studio intragruppo *Trattati vs Ecologici-After*.

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
22, 12, 1	destro	143	/	Putamen
42, 16, 61	destro	5	9, 10	Giro frontale mediale
46, -74, 53	destro	12	39	Giro angolare
56, -64, 49	destro	10	39	Lobulo parietale inferiore
-32, 32, 11	sinistro	88	45	Giro frontale inferiore p.triang.
-28, -90, 5	sinistro	20	18	Giro occipitale mediale

Tab. 12 tabella riassuntiva output SPM5 stimolo *Trattati vs Ecologici-After*.

4.4 DURING vs AFTER e AFTER vs DURING

Nell'analisi Full Factorial di secondo livello (vedi Paragrafo Software d'analisi in Materiali e Metodi), considerando i quattro aromi e le due tempistiche d'analisi, si è proseguito con l'analisi t-test di ciascun aroma *during* vs *after*, ed *after* vs *during*, al fine di monitorare come l'attivazione cerebrale cambia quantitativamente e/o qualitativamente nei due tempi di processamento di ciascuno stimolo.

Di seguito si riportano le tabelle con le attivazioni statisticamente significative ($P < 0,01$) per ciascuno stimolo nei confronti delle due tempistiche.

Agrumi

During vs After

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
46, -6, -7	destro	73	22	Giro temporale superiore
48, 2, -19	destro	10	38	Polo temporale
32, -36, -7	destro	30	20	Giro paraippocampale
24, -92, 29	destro	79	17, 18	Giro occipitale superiore
-26, -84, 5	sinistro	81	18	Giro occipitale mediale
-26, -74, 51	sinistro	44	5, 7	Lobulo parietale superiore
-22, -82, 35	sinistro	44	17, 18	Giro occipitale superiore
-28, -52, 48	sinistro	14	40	Lobulo parietale inferiore

After vs During

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
20, -4, 21	destro	95	/	Nucleo caudato
12, 28, 67	destro	16	9	Giro mediale superiore
-32, 40, 7	sinistro	11	9, 10, 46	Giro frontale mediale
-22, 0, 75	sinistro	7	6	Giro frontale superiore
-22, 24, 39	sinistro	3	9, 10, 46	Giro frontale mediale
-6, -30, 67	sinistro	25	4a	Lobulo paracentrale

Caffè

During vs After

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
16, -58, 49	destro	6	17	Precuneo
12, 8, 21	destro	11	/	Nucleo caudato
26, -36, 47	destro	157	3a	Giro postcentrale
-26, 32, -5	sinistro	68	47	Giro frontale inferiore p.orbit.

After vs During

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
12, -8, 75	destro	10	6	SMA
30, -30, 15	destro	9	13, 14, 15, 16	Insula
-28, -24, 55	sinistro	14	4p	Giro precentrale

Cioccolato

During vs After

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
44, -42, 11	destro	40	22	Giro temporale superiore
58, 4, -1	destro	11	38	Polo temporale
34, -2, -17	destro	4	/	Amigdala
34, 20, -19	destro	4	47	Giro frontale inferiore p.orbit.
-32, -52, 3	sinistro	18	18, 19	Giro linguale
-26, -8, -15	sinistro	18	/	Amigdala

After vs During

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
34, 18, 43	destro	127	9, 10	Giro frontale mediale
4, -66, 29	destro	20	17, 18	Precuneo
22, 14, 55	destro	6	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-20, 38, 41	sinistro	2421	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-10, 30, 29	sinistro	2421	24, 32, 33	Corteccia cingolata anteriore
-24, 18, 49	sinistro	124	9, 10	Giro frontale mediale

Fiori

During vs After

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
40, -52, 39	destro	164	/	hIP1
28, -6, 51	destro	42	6	SMA
20, -40, 59	destro	135	3b	Giro postcentrale
30, -40, 53	destro	135	2	Giro postcentrale
18, -30, 61	destro	135	4p	Giro precentrale
46, -6, 19	destro	42	43	Opercolo rolandico
30, -94, 25	destro	7	18	Giro occipitale mediale
-10, -96, 37	sinistro	6	17, 18	Cuneo
-36, 8, 13	sinistro	4	13, 14, 15, 16	Insula

After vs During

MNI (x,y,z)	emisfero	k	BA	Descrizione anatomica
12, 20, 63	destro	85	6	SMA
24, 40, 41	destro	33	4, 6, 8	Giro frontale superiore
- 24, 20, 15	sinistro	59	44	Lobo dell'insula
-16, 0, 75	sinistro	22	4, 6, 8	Giro frontale superiore
-58, -28, -1	sinistro	14	21	Giro temporale mediale
-28, -34, 25	sinistro	9	/	OP2

5. DISCUSSIONE

I dati presentati vengono discussi in base alle aree di attivazione specifiche per ciascun aroma, nelle due tempistiche di processamento, ed in base alle aree d'attivazione comune per tutti gli stimoli. Si mantiene anche, per le motivazioni precedentemente spiegate, la distinzione tra gli stimoli *ecologici* e quelli *trattati*.

Le discussioni e le interpretazioni presentate sono ipotesi interpretative delle attivazioni riscontrate, rafforzate da letteratura specifica sull'argomento trattato e/o da studi di neuroimaging che coinvolgono funzioni cognitive che con elevata probabilità, per la natura stessa del sistema olfattivo (vedi Introduzione), sono stimulate ed elicitate da stimoli olfattivi. Tra esse, sicuramente coinvolte risultano il linguaggio, la memoria e le emozioni.

Agrumi

Lo stimolo olfattivo agrumi è lo stimolo che ha la risposta cerebrale più peculiare tra i quattro aromi trattati, specie nella tempistica *during*.

Dalle analisi di secondo livello *Whole Brain* (vedi Risultati) emerge una netta attivazione del lobo occipitale, specificamente dell'area di Brodmann (BA) 17 corrispondente all'area visiva primaria e la BA 18 che corrisponde a quella secondaria, entrambe attivate bilateralmente. La BA 17 è fondamentale per la discriminazione del colore (Beauchamp M., et al, 1999; Clays, K., et al, 2004; Schluppeck, D., et Engel, S., 2002). L'area 17 è anche nota per essere il substrato dell'attenzione visiva (Ciaramitaro V., et al, 2007; Hopf, J., et al, 2004; Silver, M., et al, 2007; Smith A., et al, 2006). L'attenzione per gli attributi colori e forma è documentata anche per l'area 18 (Le, T., et al, 1998). L'area 18 sinistra è stata anche associata all'immaginazione visiva dal gruppo di Platel et al, nel 1997.

L'aroma agrumi nell'intervallo temporale *during* attiva anche le BA 2 e 1 nell'emisfero di sinistra. Sono aree localizzate nel giro postcentrale, e fanno parte della corteccia somatosensoriale primaria. Due gruppi di ricerca, in due recenti studi fMRI (Cheng, Y., et al, 2008; Ebisch, S., et al, 2008) hanno localizzato in queste aree dell'emisfero sinistro il sistema di neuroni specchio somatosensoriali. Dalle localizzazione delle attivazioni

descritte, sembra che lo stimolo agrumi nella fase *during* abbia un forte impatto come stimolo sinestesico¹. Olfatto e vista interagiscono, al punto che gli odori che percepiamo possono influenzare le immagini che vediamo, e viceversa. In generale, il nostro sistema sensoriale integra le informazioni provenienti da tutti i 5 sensi formando un'immagine multisensoriale del mondo. In un recentissimo studio, Zhou e collaboratori (Zhou W, et al, 2010) hanno dimostrato l'impatto della stimolazione olfattiva sulla vista. Da un punto di vista cognitivo l'effetto è interpretabile secondo la teoria del doppio codice di Paivio (1971, 1986), ossia che il concetto di agrumi, nella memoria semantica, è rappresentato vividamente anche come immagine e lo stimolo olfattivo associato ha il potere di risvegliare il "nodo immaginativo" rievocando l'immaginazione dello stimolo.

D'interesse evidenziare come nella tempistica *after* le attivazioni si spostano in aree più centrali e frontali, equiparandosi maggiormente alle attività osservate per gli altri stimoli. L'attivazione, infatti, si riscontra nelle aree corrispondenti al giro postcentrale (BA 6, 1, 2, 3) e alla SMA, attivazioni osservate anche per lo stimolo fiori (*during*), e nel giro frontale mediale (BA 9, 10, 46), comune a tutti gli stimoli. La BA 6, destra e sinistra, è riportata in letteratura, come area attivata in compiti di immaginazione motoria (Boecker H, et al, 2002; Halpern, A et Zatorre R, 1999; Malouin F, et al, 2003). Anche la BA 4 (SMA), che risulta attiva, è riportata in diversi lavori di neuroimaging (Munzert, J, et al, 2008; Porro, C, et al, 1996; Sharma N, et al, 2008; Tomasino, B, et al, 2007) come area coinvolta in compiti di immaginazione motoria oltre che essere l'aria di controllo motorio di mano, dita e polso (Blickenstorfer, A, et al, 2009; Cao, Y, et al, 1993; Grefkes, C, et al, 2008; Kurth R, et al, 2000; van der Kallen B, et al, 1996). Anche queste attivazioni sembrano confermare l'ipotesi che i soggetti, durante e dopo la stimolazione con l'aroma agrumi, immaginino lo stimolo sia nelle caratteristiche percettive di colore e forma, sia nel gesto di manipolazione dello stesso. Da sottolineare, come, nella fase *after*, compaiano anche attivazioni di aree frontali, strettamente connesse sia con l'elaborazione di stimoli olfattivi, che con l'attribuzione di giudizi edonistici; nello specifico, il giro frontale mediale corrispondente alle BA 9, 10, 46. Le aree 9 e 10, infatti, sono coinvolte nel processamento di stimoli olfattivi (Royet, J et al, 1999) ed in quello di stimoli emotivi

¹ Sinestesia: detta anche sensazione secondaria, la sinestesia è un interessamento di altri sistemi sensoriali oltre a quello specifico.

ed edonistici (Bermpohl F, et al, 2006; Lane, R, et al, 1997). Le aree 9 e 10, attivazione comune a tutti gli stimoli, sono aree fondamentali anche per i processi di memoria, sia per la *working memory*² (Pochon J, et al, 2002; Raye, C, et al, 2002; Zhang, J et al, 2003), che per il recupero mnesico (Duzel, E, et al, 2001; Tulving, E, et al, 1994). La *working memory* risulta fondamentale nel mantenimento dello stimolo al fine di processarlo semanticamente ed edonisticamente (compiti entrambi coinvolti nell'esperimento), mentre il recupero delle informazioni mnesiche evidenzia il legame tra stimolo olfattivo e memoria. Si riscontra, inoltre, anche l'attivazione della BA 46, anch'essa attivazione comune a tutti gli stimoli. L'area 46, che corrisponde al giro frontale mediale nella sua parte anteriore, è coinvolta nel sistema dei neuroni specchio (Buccino, G, et al, 2004), nel riconoscimento di stimoli mnesici (Kapur, S, et al, 1994; Ranganath, C, et al, 2003) e nel processamento semantico (Demb, J, et al, 1995). Anche nel confronto tra agrumi *during* e agrumi *after*, e viceversa, (vedi Risultati) si evidenzia come nella prima fase di processamento dell'aroma agrumi vi sia un maggior coinvolgimento delle aree visive e somatosensoriali a discapito delle aree frontali, mentre nella fase successiva, emerge un'attivazione più simile a quella riscontrata per gli altri stimoli utilizzati, con il coinvolgimento delle aree più frontali ed anche del nucleo caudato che risulta anch'esso coinvolto nell'attribuzione di un valore edonistico di stimoli a valenza emotiva (Lane, R et al, 1998).

Caffè

Il caffè è l'aroma, tra i quattro utilizzati in questo studio, che presenta l'attivazione più circoscritta nelle aree frontali, nella corteccia cingolata e nel nucleo caudato, sia nella fase *during* che in quella *after*.

Nella prima fase di elaborazione dello stimolo, le aree di attivazione sono: la corteccia cingolata mediale destra (BA 24, 32, 33), il giro orbitale mediale destro (BA 11), il giro frontale inferiore, nella parte orbitale, sinistro (BA 47) e il nucleo caudato sinistro. La corteccia cingolata è parte del sistema limbico, struttura cerebrale coinvolta nel

² Working memory: la wm (memoria di lavoro) è un sistema temporaneo d'immagazzinamento e gestione delle informazioni che devono essere processate dai sistemi cognitivi (linguaggio, ragionamento, attribuzione di significato etc.) (Baddeley, A, 1986).

processamento di stimoli a valenza emotiva ed edonistica; nello specifico le aree 24, 32 e 33 sono aree corticali deputate all'elaborazione di stimoli gustativi (Faurion, A, et al, 1998; Kinomura, S, 1994), a dimostrazione della sinergia tra stimoli olfattivi e gustativi. L'aroma, infatti è definibile come la caratteristica sensoriale di un cibo od un'altra sostanza derivante dalla combinazione di odore e sapore; non sorprende quindi, che l'odore del caffè attivi aree deputate all'elaborazione del gusto. Il giro frontale inferiore (parte orbitale), è coinvolto nel processamento di odori familiari (Ciumas, C, et al, 2008; Royet, J, et al, 1999; Savic I, et Berglund, H, 2004) così come l'area 11, evidenziata da Royet et al (Royet, J, et al, 1999) come area funzionalmente attivata nel processamento percettivo e semantico degli odori, e confermata come area deputata al processamento di stimoli olfattivi dal gruppo di Miyanari in un più recente studio di fMRI (Miyanari, A et al, 2007). Importante funzione del giro frontale inferiore (p. orbitale) sinistro è il processamento semantico degli stimoli (Chou, T, et al, 2006; De Carli, D, et al, 2007), elaborazione cognitiva consona all'esperimento condotto, in quanto la ricerca di un'etichetta semantica è indissolubilmente legata al riconoscimento stesso dello stimolo. Quest'area corticale, inoltre, è associata alla working memory (Kapur et al, 1994).

L'attivazione del nucleo caudato, come già evidenziato per lo stimolo agrumi, è stata dimostrata per l'elaborazione di stimoli a valenza edonistica (Lane, R, et al, 1997).

L'attivazione circoscritta di aree frontali che non solo sono coinvolte nell'elaborazione di stimoli olfattivi e gustativi, bensì hanno anche fondamentale ruolo nel mantenimento della working memory e dell'attenzione (Williams, J, et al, 2005), può essere interpretata, mantenendosi solo come un'ipotesi interpretativa, come la controparte anatomica e funzionale della caratteristica che, nell'immaginario comune, si lega all'aroma del caffè e ad uno dei suoi rituali di consumo, ossia quello di risvegliare l'attenzione e la concentrazione. Da uno studio condotto da scienziati giapponesi (Han-Seok, S, et al, 2008), è emerso che l'aroma del caffè è in grado di attivare nel DNA di topi da laboratorio molti di quegli stessi geni accesi da questo alimento, importanti per il risveglio (l'attività dei geni spenti durante il sonno, riprende a livelli fisiologici con l'odore del caffè, nello specifico si tratta del gene *Gir*, coinvolto nel controllo neuroendocrino, e il gene *Nfgr*, che controlla lo stress ossidativo). Le prove sull'essere umano di uno stesso effetto sono scarse o inesistenti, seppur molto ricercate per

l'importanza che l'aroma del caffè potrebbe avere come stimolo per risvegliare l'attenzione e la concentrazione. L'fMRI può essere una metodica adatta allo studio di quest'ipotetica funzione dell'aroma caffè sull'essere umano.

Nella fase successiva di elaborazione dello stimolo (during), il caffè risulta attivare il giro frontale mediale sinistro corrispondente alle BA 9, 10 e 46, che, come si è visto nella discussione dello stimolo agrumi, è fondamentale per le funzioni cognitive di working memory (Pochon, J, et al, 2002; Raye, C, et al, 2002; Zhang et al, 2003), recupero di informazioni mnesiche (Duzel, E, 2001; Tulving, E, 1994), categorizzazione semantica (Hugdall, K, et al, 1999), nonché per il processamento di stimoli emotivi (Berpohl, et al, 2006; Lane, R, 1997).

Dal confronto delle due tempistiche di elaborazione per lo stimolo caffè (vedi Risultati), risulta che nella fase after, c'è un'attivazione significativa (in confronto con la fase during) anche dell'area motoria supplementare (SMA), corrispondente alla BA 6, area coinvolta anch'essa nella working memory, nella memoria a lungo termine (LMT) e nel recupero di parole (Warburton, E, et al, 1996), oltre ad essere l'area d'interesse dei neuroni specchio e dell'immaginazione motoria. Quest'area si ritrova anche nell'elaborazione degli stimoli agrumi (after) e fiori (during).

Cioccolato

Le attivazioni emerse per lo stimolo cioccolato sono simili a quelle riscontrate per il caffè, ma meno circoscritte alle aree frontali, specie nella fase during, coinvolgendo anche il giro calcarino (BA 17, 18) destro e il lobulo V destro del cervelletto.

Le aree frontali sono quelle descritte e discusse per lo stimolo caffè, aree che coinvolgono le funzioni di working memory, recupero delle informazioni, memoria semantica e ricerca di parole (Heim, S, et al, 2005), oltre che essere le aree coinvolte nell'elaborazione di stimoli olfattivi.

La BA 17 e 18, rispettivamente area visiva primaria e secondaria, sono deputate al processamento di stimoli visivi. Come nel caso degli agrumi, quindi, anche lo stimolo cioccolato, sembra racchiudere in sé un potere evocativo d'immagini visive associate allo stimolo stesso.

Attivazione peculiare del cioccolato è quella del cervelletto. Il cervelletto nella tradizione medico scientifica è sempre stato deputato al controllo motorio, ma recentemente si è evidenziata l'importanza del coinvolgimento di questa struttura anatomica anche in funzioni cognitive in sinergia con la corteccia cerebrale. Inoltre, il cervelletto è anche un correlato anatomico dell'elaborazione edonistica delle emozioni, sia piacevoli che spiacevoli (Lane, R, et al, 1997).

Nella seconda fase di elaborazione dello stimolo cioccolato (after), le attivazioni si spostano maggiormente alle aree frontali, escludendo le BA 17 e 18 ed il cervelletto e mimando, in gran parte, quella che è l'attivazione dipendente dallo stimolo caffè (sia during che after), ossia il giro orbitale mediale, e il giro frontale superiore ed inferiore nella porzione orbitale. Tuttavia, il cioccolato nella fase after induce attivazione bilaterale delle aree frontali sopradette, mentre l'elaborazione del caffè è circoscritta nell'emisfero sinistro.

Fiori

Lo stimolo fiori risulta, in entrambi le tempistiche di elaborazione, quello più complesso, coinvolgendo, in pratica, l'attivazione di tutte le aree riscontrate attivate dai 3 stimoli sopra descritti. Le aree di attivazione, infatti, sono maggiormente distribuite tra le regioni frontali, il sistema limbico e le aree ippocampali e la corteccia somatosensoriale. Ad eccezione delle aree visive, lo stimolo fiori racchiude in sé l'elaborazione degli aspetti coinvolti nell'elaborazione degli altri stimoli, con la peculiarità di attivare maggiormente le aree deputate al controllo motorio e all'immaginazione motoria, in entrambe le fasi di elaborazione dello stimolo.

Nella fase during, infatti, risultano attivate le aree di Brodmann 3a e 6 dell'emisfero destro, aree deputate, rispettivamente, al controllo dei movimenti della mano e del sistema dei neuroni specchio somatosensoriali (BA 3a) (Bernard, R, et al, 2002; Ebisch, S, et al, 2008) e al sistema di neuroni specchio motori e all'immaginazione motoria (BA 6) (Boecker, H, et al, 2002; Halpern, A, et Zatorre, R, 1999; Malouin, F, et al, 2003). La BA 6, inoltre, come evidenziato per lo stimolo cioccolato -after- è implicata nella working memory e nella memoria a lungo termine nell'emisfero sinistro e nel recupero semantico in entrambi gli emisferi (Warburton, E, et al, 1996). Sempre nella fase during

dell'elaborazione dello stimolo fiori si evidenzia l'attivazione del giro frontale inferiore nelle porzioni opercolare (BA 44, Area di Broca), triangolare (BA 45) ed orbitale (BA 47). L'area 44, come già evidenziato, è responsabile oltre che del processamento semantico e del recupero di parole, anche dell'elaborazione di stimoli olfattivi familiari così come lo è la BA 45 (Ciumas, C, et al, 2008; Savic, I et Berglund, H, 2004). La BA 47 è coinvolta, oltre che nel processamento semantico (Chou, T, et al, 2006; De Carli, D, et al, 2007), nell'elaborazione di odori familiari (Ciumas, C, et al, 2008; Savic, et Berglund, H, 2004).

Sempre nella fase *during* si riscontra l'attivazione della corteccia cingolata anteriore sinistra e mediale destra (BA 24, 32, 33), struttura limbica coinvolta nel processamento di stimoli emotivi, olfattivi (Cerf, D, et Murphy, C, 2006; Qureshy, A et al, 2000; Royet, J, et al, 1999). Peculiare dello stimolo fiori il reclutamento dell'area paraippocampale (lobo temporale mediale), area indispensabile per la memoria autobiografica (Daselaar, S et al, 2008; Vandekerckhove, M, et al, 2005; Viard, A, et al, 2007) e nello specifico nella memoria olfattiva (Cerf-Ducastel, B, et Murphy, C, 2006; Ciumas, C, et al, 2008; Marciari L, et al, 2006). L'attivazione dell'insula nella porzione lobare sinistra che si evidenzia nella fase *during*, è anch'essa associata a stimoli olfattivi (de Araujo, I, et al, 2003; Wang, J, et al, 2005).

Passando nella fase di elaborazione *after* dello stimolo fiori si mantengono attive le stesse aree (vedi Risultati, confronto *during vs after* e *after vs during*) con minime diversificazioni, come ad esempio il passaggio dal lobo temporale mediale (in fase *during*) al polo temporale (BA 38, 22) anch'esso necessario al recupero di informazioni a carattere multisensoriale (memoria a lungo termine) (Dolan, R, et al, 2000; Maguire, E, et al, 2000; Takashima A, et al, 2007).

Nel complesso, quindi, sembra che lo stimolo fiori sia lo stimolo maggiormente associato al recupero di informazioni autobiografiche, dato il coinvolgimento del lobo temporale che sottende, specie nella porzione paraippocampale e ippocampale, alla memoria a lungo termine. Le attivazioni della corteccia somatosensoriale e di quella motoria, lo accomunano allo stimolo agrumi, evidenziando come questi due stimoli (stimoli *ecologici*) siano in grado di innescare anche l'immaginazione motoria e somatosensoriale (come il controllo dei movimenti della mano, dita e polso), come se le caratteristiche

semantiche e proprie dell'essere elementi naturali e manipolabili, fossero strettamente legate allo stimolo stesso, nella fattispecie, come se, lo stimolo in modalità olfattiva fosse in grado di riattivare queste caratteristiche che appartengono alla più generale rappresentazione di queste due categorie di stimoli naturali.

Lo stimolo fiori, inoltre, recluta un maggior numero di aree deputate al processamento linguistico dello stimolo, sia nella prima fase di elaborazione dello stimolo che in quella successiva. Quest'attivazione può spiegare la maggiore complessità "cognitiva" e "semantica" dello stimolo fiori rispetto agli altri stimoli trattati (vedi Materiali e Metodi, stimoli).

Mantenendo la distinzione degli stimoli nelle due categorie proposte *Ecologici* e *Trattati*, dalle analisi si evidenzia come gli stimoli agrumi e fiori attivino maggiormente le aree deputate all'immaginazione delle caratteristiche percettive e manipolatorie degli stimoli, in entrambe le fasi elaborative (vedi Risultati), mentre gli stimoli cioccolato e caffè si mantengono maggiormente ad un livello di elaborazione olfattiva/gustativa e di attribuzione edonistica e valenza affettiva, con il coinvolgimento anche di aree sottocorticali come il putamen e il caudato e del cervelletto.

APPENDICE A

L'OLFATTOMETRO

Sistema di iniezione di aromi

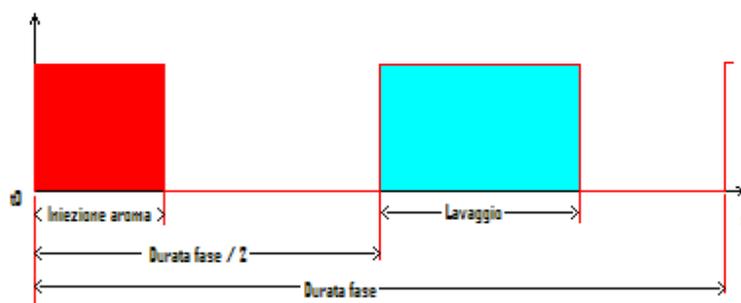
Il sistema è dotato di un'elettronica di controllo per gestire flussi d'aria contenenti aromi da iniettare nell'apparato olfattivo (attraverso cinque tubicini (uno per ciascun aroma ed uno per il neutro) in teflon dal diametro interno di 1,5 mm convergenti in una mascherina monouso posizionata sul viso del soggetto mentre esegue il compito sdraiato supino in RM).

I seguenti dispositivi sono impiegati per la parte idraulica:

-) una pompa
-) 4 elettrovalvole associate a 4 sorgenti aromatiche
-) 1 elettrovalvola per il lavaggio del sistema di convogliamento

Il sistema di controllo elettronico è dotato di un display alfanumerico che illustra lo stato della macchina.

Il sistema prevede l'invio di un pacchetto di aromi su quattro canali, così sequenziati: 24 fasi di iniezione successive la cui durata è di 24 sec; ogni fase di iniezione parte con un'iniezione di aroma della durata di 2 sec, seguita da una pausa, ed un'altra di aria pulita, detta di lavaggio, con durata di 5 sec che inizia a metà della fase in corso, ovvero a 12 sec dall'inizio della fase e seguita da un'altra pausa. Il seguente grafico illustra la sequenza temporale di una delle 24 fasi di iniezione.



Le fasi di iniezione sono complessivamente 24, con le seguenti caratteristiche e limitazioni: ogni blocco sperimentale (il totale delle fasi di iniezione successive) è costituito da 24 stimolazioni (trials), di cui 12 sono costituite dagli stimoli olfattivi (4 aromi ripetuti in modo randomizzato per 3 volte ciascuno) e 12 sono costituite da aria

pura che viene trattata come se fosse uno stimolo (in modo da poter, in fase di analisi sperimentale dei dati, confrontare l'attivazione di ciascun aroma con l'attivazione derivante dall'aria pura, intesa come stimolo neutro). In questo modo al soggetto vengono presentate 24 stimolazioni totali: presentazione di ciascun aroma per tre volte, pseudo-randomizzate, con la limitazione che ciascuno stimolo aromatico sia seguito sempre dallo stimolo neutro (aria pura).

Esempio di sequenza:

gli stimoli aromatici sono i seguenti: Caffè (C), Agrumi (A), Fiore (F) Cioccolato (Ci), Neutro (N).

un'ipotetica sequenza dei 24 lavaggi sequenziali ha la seguente struttura:

C, N, C, N, A, N, F, N, Ci, N, Ci, N, C, N, F, N, A, N, A, N, Ci, N, F, N

Impostazione della durata di una fase:

Accendere la macchina tenendo premuto il tasto *start*, il display illustra “*setup durata fase:24s*”, agire sui tasti Start e Stop per incrementare o decrementare il tempo voluto, il dato rimarrà in memoria, successivamente spegnere e riaccendere la macchina per entrare nella modalità di utilizzo normale.

Impostazione della durata di iniezione:

Accendere la macchina tenendo premuto il tasto *stop*, il display illustra “*setup durata iniezione:2s*”, agire sui tasti Start e Stop per incrementare o decrementare il tempo voluto, il dato rimarrà in memoria, successivamente spegnere e riaccendere la macchina per entrare nella modalità di utilizzo normale.

Impostazione della durata del lavaggio:

Accendere la macchina tenendo premuto il tasto *start* e *stop* contemporaneamente, il display illustra “*setup durata lavaggio:5s*”, agire sui tasti start e stop per incrementare o decrementare il tempo voluto, il dato rimarrà in memoria, successivamente spegnere e riaccendere la macchina per entrare nella modalità di utilizzo normale.

Uso normale:

All'accensione appare un messaggio iniziale con l'indicazione “*premi start per iniziare*”. Dopo la pressione del tasto *start*, il sistema calcola la sequenza casuale di canali che utilizzerà per il ciclo in corso, ad esempio: 2-4-3-1-3-2-3-1-4-1-2-1, composta da 12 numeri.

Durante la fase di *run*, premendo il tasto *pause*, si blocca l'attività corrente; ad una successiva pressione di *start*, il sistema riprende il ciclo dal punto precedente.

Premendo *stop*, si interrompe il ciclo in corso, e ad una successiva pressione di *start*, verrà generata una nuova sequenza.

L'algoritmo di calcolo considera che sia garantita l'uscita di almeno un'occorrenza per ogni canale, e l'occorrenza successiva sia diversa dalla precedente.

Il display da 16 caratteri su due righe è così strutturato:

S	:	2	*	3	1	3	2	3	1	4	1	2	1		I-
R	u	n	-	F	a	s	e		1		-	1		s	p-L

S: i 12 numeri indicano la sequenza estratta

*: lampeggia sul numero corrispondente al canale di iniezione attivo

I-p-L: indica rispettivamente lo stato: Iniezione-pausa-lavaggio

Run: (Pau-Stp): lo stato del ciclo, rispettivamente in atto (Run), in pausa (Pau), bloccato (Stop).

Fase: indica un numero progressivo da 1 a 12, corrispondente alla fase attiva ed alla posizione dell'asterisco.

1s: conta secondi della singola fase di iniezione

Al termine del blocco di iniezioni, il display indicherà nuovamente la sequenza usata, un indicatore progressivo di sequenza, ed uno countdown da 5 min, per attendere l'avvio di una nuova sequenza.



Fig. 1 L'olfattometro descritto in Appendice

Un ringraziamento speciale al Chiar.mo Prof. Dott. Piero Paolo Battaglini per essersi dimostrato un Tutor con un impagabile lato umano, oltre che, un Professore competente e presente. Ringrazio il reparto di Radiologia dell'Ospedale di Cattinara per l'indispensabile collaborazione e disponibilità; il Chiar.mo Prof. Gilberto Pizzolato e il Dr. Marcello Naccarato per la collaborazione e l'aiuto. Ringrazio Furio e Luciano per aver creduto in me ed avermi sostenuta. Un ringraziamento sentito a Valentina ed Erica per essere state sempre presenti.

Laura Romoli

BIBLIOGRAFIA

Bachelard, G, 1960. La Poétique de la rêverie. ed. italiana: La poetica della rêverie, Bari, Dedalo, 1984.

Baddeley, A, 1986. Working memory. Oxford: Clarendon Press.

Beauchamp, MS, Haxby, JV, Jennings, JE, DeYoe, EA, 1999. An fMRI version of the Farnsworth-Munsell 100-Hue test reveals multiple color-selective areas in human ventral occipitotemporal cortex. *Cerebral Cortex*, **9** 257-63.

Berpohl, F, Pascual-Leone, A, Amedi, A, Merabet, LB, Fregni, F, Gaab, N, Alsop, D, Schlaug, G, Northoff, G., 2006. Attentional modulation of emotional stimulus processing: an fMRI study using emotional expectancy. *Hum. Brain. Mapp.* **27** 662-77.

Bernard, RA, Goran, DA, Sakai, ST, Carr, TH, McFarlane, D, Nordell B, Cooper, TG, Potchen, EJ, 2002. Cortical activation during rhythmic hand movements performed under three types of control: an fMRI study. *Cogn Affect Behav Neurosci.*, **2** 271-81.

Berthoz, A, 1997. Parietal and hippocampal contribution to topokinetic and topographic memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **352** 1437-48.

Blickenstorfer, A, Kleiser, R, Keller, T, Keisker, B, Meyer, M, Riener, R, Kollias, S, 2009. Cortical and subcortical correlates of functional electrical stimulation of wrist extensor and flexor muscles revealed by fMRI. *Hum Brain Mapp.*, **3** 963-75.

Boecker, H, Ceballos-Baumann, AO, Bartenstein, P, Dagher, A, Forster, K, Haslinger, B, Brooks, DJ, Schwaiger, M, Conrad, B. 2002. A H(2)(15)O positron emission tomography study on mental imagery of movement sequences--the effect of modulating sequence length and direction. *Neuroimage*, **17** 999-09.

Buccino, G, Vogt, S, Ritzl, A, Fink, GR, Zilles, K, Freund, HJ, Rizzolatti, G, 2004. Neural circuits underlying imitation learning of hand actions: an event-related fMRI study. *Neuron*, **42** 323-34.

Buck, L, Axel, R, 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65** 175-87.

Cao, Y, Towle, VL, Levin, DN, Balter, JM, 1993. Functional mapping of human motor cortical activation with conventional MR imaging at 1.5 T. *J Magn Reson Imaging.*, **6** 869-75.

Castriota-Scaderbeg, A, Hagberg, G, Cerasa, A, Committeri, G, Galati, G, Patria, F, Pitzalis, S, Caltagirone, C, Frackowiak, R, 2005. The appreciation of wine by sommeliers: a functional magnetic resonance study of sensory integration. *Neuroimage*, **25**, 570-8.

- Cerf-Ducastel, B, Murphy, C, 2006. Neural substrates of cross-modal olfactory recognition memory: an fMRI study. *Neuroimage*, **31** 386-96.
- Cheng, Y, Yang, CY, Lin, CP, Lee, PL, Decety J, 2008. The perception of pain in others suppresses somatosensory oscillations: a magnetoencephalography study. *Neuroimage*, **40** 1833-40.
- Chou, TL, Booth, JR, Bitan, T, Burman, DD, Bigio, JD, Cone, NE, Lu, D, Cao, F, 2006. Developmental and skill effects on the neural correlates of semantic processing to visually presented words. *Hum. Brain Mapp.* **27** 915-924.
- Ciaramitaro, VM, Buracas, GT, Boynton, GM, 2007. Spatial and cross-modal attention alter responses to unattended sensory information in early visual and auditory human cortex. **98** 2399-413.
- Ciomas, C, Lindström, P, Aoun, B, Savic, I, 2008. Imaging of odor perception delineates functional disintegration of the limbic circuits in mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroimage*, **39** 578-92.
- Clays, KG, Dupont, P, Cornette, L, Sunaert, S, Van Hecke, P, De Schutter, E, Orban, GA, 2004. Color discrimination involves ventral and dorsal stream visual areas. *Cereb Cortex*, **14** 803-22.
- Daselaar, SM, Rice, HJ, Greenberg, DL, Cabeza, R, LaBar, KS, Rubin, DC, 2008. The spatiotemporal dynamics of autobiographical memory: neural correlates of recall, emotional intensity, and reliving. *Cereb. Cortex*, **18** 217-29.
- De Araujo, IE, Rolls, ET, Kringelbach, ML, McGlone, F, Phillips N, 2003. Taste-olfactory convergence, and the representation of the pleasantness of flavour, in the human brain. *Eur J Neurosci*, **18** 2059-68.
- De Carli, D, Garreffa, G, Colonnese, C, Giulietti, G, Labruna, L, Briselli, E, Ken, S, Macrì, MA, Maraviglia, B, 2007. Identification of activated regions during a language task. *Magn Reson Imaging*, **25** 933-8.
- Demb, JB, Desmond, JE, Wagner, AD, Vaidya, CJ, Glover, GH, Gabrieli, JD, 1995. Semantic encoding and retrieval in the left inferior prefrontal cortex: a functional MRI study of task difficulty and process specificity. *J Neurosci.*, **15** 5870-8.
- Dolan, RJ, Lane, R, Chua, P, Fletcher, P, 2000. Dissociable temporal lobe activations during emotional episodic memory retrieval. *Neuroimage*, **11** 203-9.
- Doty, R, Marcus, A, Lew, W, 1996. Development of the 12-item cross-cultural smell identification test (CC-SIT). *Laryngoscope*, **106** 353-356.

Düzel, E, Picton, TW, Cabeza, R, Yonelinas, AP, Scheich, H, Heinze, HJ, Tulving, E, 2001. Comparative electrophysiological and hemodynamic measures of neural activation during memory-retrieval. *Hum Brain Mapp.* **13** 104-23.

Ebisch, SJ, Perrucci, MG, Ferretti, A, Del Gratta, C, Romani, GL, Gallese, V, 2008. The sense of touch: embodied simulation in a visuotactile mirroring mechanism for observed animate or inanimate touch. *J Cogn Neurosci.*, **20** 1611-23.

Faurion, A, Cherf, B, Le Bihan, D, Pillias, AM. 1998. fMRI study of taste cortical areas in humans. *Ann. NY Acad. Sci.* **78** 535-545.

Friston, K, 2005. Human Brain Function Introduction Experimental design and Statistical: Parametric Mapping. The Wellcome Dept. of Cognitive Neurology, University College London Queen Square, London, UK WC1N 3BG

Grefkes, C, Eickhoff, SB, Nowak, DA, Dafotakis, M, Fink, GR, 2008. Dynamic intra- and interhemispheric interactions during unilateral and bilateral hand movements assessed with fMRI and DCM. *Neuroimage*, **41** 1382-94.

Gottfried, J.A. et al. 2004. Remembrance of odors past. Human olfactory cortex in cross-modal recognition memory. *Neuron*, **42**, 687-695.

Halpern, AR, Zatorre, RJ, 1999. When that tune runs through your head: a PET investigation of auditory imagery for familiar melodies. *Cereb Cortex.*, **9** 697-704.

Han-Seok, S, Misato, H, Junko, S, Randeep, R, In Kyeong, H, Yoshinori, M, 2008. Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: a selected transcript- and 2D gel-based proteome analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **56** 4665-4673.

Hebb, D. 1949. The organization of behavior; a neuropsychological theory. Wiley, New York.

Heim, S, Alter, K, Ischebeck, AK, Amunts, K, Eickhoff, SB, Mohlberg, H, Zilles, K, von Cramon, DY, Friederici, AD, 2005. The role of the left Brodmann's areas 44 and 45 in reading words and pseudowords. *Brain Res Cogn Brain Res*, **25** 982-93.

Hopf, JM, Noesselt, T, Tempelmann, C, Braun, J, Schoenfeld, MA, Heinze, HJ, 2004. Popout modulates focal attention in the primary visual cortex. *Neuroimage*, **22** 574-82.

Hugdahl, K, Lundervold, A, Erslund, L, Smievoll, AI, Sundberg, H, Barndon, R, Roscher, BE, 1999. Left frontal activation during a semantic categorization task: an fMRI-study. *Int J Neurosci.*, **99** 49-58.

Kapur, S, Craik, FI, Tulving, E, Wilson, AA, Houle, S, Brown, GM, 1994. Neuroanatomical correlates of encoding in episodic memory: levels of processing effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91 2008-11.

Kinomura, S, 1994. Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography. *Brain Res*, **659** 263-266.

Kurth, R, Villringer, K, Curio, G, Wolf, KJ, Krause, T, Repenthin, J, Schwiemann, J, Deuchert, M, Villringer, A, 2000. fMRI shows multiple somatotopic digit representations in human primary somatosensory cortex. *Neuroreport*, **11** 1478-91.

Lane, RD, Reiman, EM, Bradley, MM, Lang, PJ, Ahern, GL, Davidson, RJ, Schwartz, GE, 1997. Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion. *Neuropsychologia*, **35** 1437-44.

LeDoux, J. 1986. Sensory system and emotions: a model of affective processing. *Integr. Psychiat.*, **4** 237-248.

Le, TH, Pardo, JV, Hu, X, 1998. 4 T-fMRI study of nonspatial shifting of selective attention: cerebellar and parietal contributions. *J Neurophysiol.*, **79** 1535-48.

Lowen, S, et Lucas, S, 2006. A low-cost, MR-compatible olfactometer. *Behav. Res. Methods*, **38** 307-313.

Maguire, EA, Mummery, CJ, Büchel, C, 2000. Patterns of hippocampal-cortical interaction dissociate temporal lobe memory subsystems. *Hippocampus*, **10** 475-82.

Malouin, F, Richards, CL, Jackson, PL, Dumas, F, Doyon, J, 2003. Brain activations during motor imagery of locomotor-related tasks: a PET study. *Hum Brain Mapp.*, **19** 47-62.

Marciani, L, Pfeiffer, JC, Hort, J, Head, K, Bush, D, Taylor, AJ, Spiller, RC, Francis, S, Gowland, PA, 2006. Improved methods for fMRI studies of combined taste and aroma stimuli. *J Neurosci Methods.*, **31** 386-96.

Miyanari, A, Kaneoke, Y, Noguchi, Y, Honda, M, Sadato, N, Sagara, Y, Kakigi, R, 2007. Human brain activation in response to olfactory stimulation by intravenous administration of odorants. *Neurosci Lett.*, **423** 6-11.

Munzert, J, Zentgraf, K, Stark, R, Vaitl, D, 2008. Neural activation in cognitive motor processes: comparing motor imagery and observation of gymnastic movements. *Exp Brain Res.*, **188** 437-44.

Paivio, A, 1971. Imagery and verbal processes. New York: Holt, Rinehart, and Winston.

Paivio, A, 1986. *Mental representation: a dual coding approach*. Oxford. England: Oxford University Press.

Pochon, JB, Levy, R, Fossati, P, Lehericy, S, Poline, JB, Pillon, B, Le Bihan, D, Dubois, B, 2002. The neural system that bridges reward and cognition in humans: an fMRI study. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99** 5669-74.

Porro, CA, Francescato, MP, Cettolo, V, Diamond, ME, Baraldi, P, Zuiani, C, Bazzocchi, M, di Prampero, PE, 1996. Primary motor and sensory cortex activation during motor performance and motor imagery: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci.*, **16** 7688-98.

Proust, M. *À la recherche du temps perdu*. 1913-1927.

Qureshy, A, Kawashima, R, Imran, MB, Sugiura, M, Goto, R, Okada, K, Inoue, K, Itoh, M, Schormann, T, Zilles, K, Fukuda, H, 2000. Functional mapping of human brain in olfactory processing: a PET study. *J Neurophysiol.*, **84** 1656-66.

Ranganath, C, Johnson, MK, D'Esposito, M, 2003. Prefrontal activity associated with working memory and episodic long-term memory. *Neuropsychologia*, **41** 378-89.

Raye, CL, Johnson, MK, Mitchell, KJ, Reeder, JA, Greene, EJ, 2002. Neuroimaging a single thought: dorsolateral PFC activity associated with refreshing just-activated information. *Neuroimage*, **15** 447-53.

Royet, JP, Koenig, O, Gregoire, MC, Cinotti, L, Lavenne, F, Le Bars, D, Costes, N, Vigouroux, M, Farget, V, Sicard, G, Holley, A, Mauguière, F, Comar, D, Froment, JC, 1999. Functional anatomy of perceptual and semantic processing for odors. *J Cogn Neurosci.* **11** 94-109.

Savic, I, Berglund, H, 2004. Passive perception of odors and semantic circuits. *Hum Brain Mapp*, **21** 271-8.

Schluppeck, D, Engel, SA, 2002. Color opponent neurons in V1: a review and model reconciling results from imaging and single-unit recording. *J Vis.*, **2** 480-92.

Sharma, N, Jones, PS, Carpenter, TA, Baron, JC, 2008. Mapping the involvement of BA 4a and 4p during Motor Imagery. *Neuroimage*, **41** 92-9.

Silver, MA, Ress, D, Heeger, DJ, 2007. Neural correlates of sustained spatial attention in human early visual cortex. *J Neurophysiol*, **97** 229-37.

Smith, AT, Cotillon-Williams, NM, Williams, AL, 2006. Attentional modulation in the human visual cortex: the time-course of the BOLD response and its implications. *Neuroimage*, **29** 328-34.

Takashima, A, Nieuwenhuis, IL, Rijpkema, M, Petersson, KM, Jensen, O, Fernández, G, 2007. Memory trace stabilization leads to large-scale changes in the retrieval network: a functional MRI study on associative memory. *Learn Mem*, **14** 472-9. .

Tomasino, B, Werner, CJ, Weiss, PH, Fink, GR, 2007. Stimulus properties matter more than perspective: an fMRI study of mental imagery and silent reading of action phrases. *Neuroimage*, **36** 28-41.

Tulving, E, 1972. Episodic and semantic memory. In E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organization of memory*, (pp. 381-401). New York: Academic Press.

Tulving, E, Kapur, S, Markowitsch, HJ, Craik, FI, Habib, R, Houle, S, 1994. Neuroanatomical correlates of retrieval in episodic memory: auditory sentence recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91** 2012-5.

Van der Kallen, BF, Rijpkema, G, van Erning, LJ, Merx, JL, Horstink, MW, Thijssen, HO, 1996. Functional MRI: imaging of motor cortex function. *ed Tijdschr Geneeskd*, **140** 248-54.

Vandekerckhove, MM, Markowitsch, HJ, Mertens, M, Woermann, FG. 2005. Bi-hemispheric engagement in the retrieval of autobiographical episodes. *Behav Neurol*, **16** 203-210..

Viard, A, Piolino, P, Desgranges, B, Chételat, G, Lebreton, K, Landeau, B, Young, A, De La Sayette, V, Eustache, F, 2007. Hippocampal activation for autobiographical memories over the entire lifetime in healthy aged subjects: an fMRI study. *Cereb Cortex*.**17** 2453-67.

Wang, J, Eslinger, PJ, Smith, MB, Yang, QX, 2005. Functional magnetic resonance imaging study of human olfaction and normal aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, **60** 510-4.

Warburton, E, Wise, RJ, Price, CJ, Weiller, C, Hadar, U, Ramsay, S, Frackowiak, RS, 1996. Noun and verb retrieval by normal subjects. Studies with PET. *Brain*, **119** 159-79.

Williams, JH, Waiter, GD, Perra, O, Perrett, DI, Whiten, A, 2005. An fMRI study of joint attention experience. *Neuroimage*, **25** 133-40.

Zhang, JX, Leung, HC, Johnson, MK, 2003. Frontal activations associated with accessing and evaluating information in working memory: an fMRI study. *Neuroimage*, **20** 1531-9.

Zhou, W, Jiang, Y, He, S, Chen, D, 2010. Olfaction modulates visual perception in binocular rivalry. *Curr.Biol.* **20** 1356-8.