



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN
PSICOLOGIA COGNITIVA, PSICOFISIOLOGIA E PERSONALITA'
(XXV CICLO)

**PARADIGMI ASSOCIATIVI DI TMS APPLICATI ALLO
STUDIO DELLA RELAZIONE TRA SONNO E PLASTICITA'
SINAPTICA**

Dottorando: Dott. Maurizio Gorgoni

Tutor: Prof. Luigi De Gennaro

Co-Tutor: Prof. Fabio Ferlazzo

INDICE

Introduzione	4
Capitolo 1. Lo studio della plasticità cerebrale nell'uomo tramite paradigmi associativi di TMS	
1.1. Lo studio del Potenzamento a Lungo Termine (LTP) nell'uomo con TMS	8
1.2. Modificazioni plastiche nella corteccia motoria	20
1.3. Modificazioni plastiche nella corteccia somatosensoriale	35
Capitolo 2. La relazione tra plasticità cerebrale, sonno e pressione verso il sonno	
2.1. L' "Ipotesi di Omeostasi Sinaptica"	42
2.1.1. Veglia e potenziamento sinaptico	
2.1.2. Potenzamento sinaptico ed omeostasi ad onde lente	
2.1.3. Omeostasi ad onde lente e <i>downscaling</i> sinaptico	
2.1.4. <i>Downscaling</i> sinaptico e <i>performance</i>	
2.2. Conferme dai modelli animali	52
2.3. L' induzione di effetti di plasticità LTP-like nell'uomo	58
2.4. Plasticità, eccitabilità corticale e pressione verso il sonno. Una possibile relazione?	65
Capitolo 3. La ricerca	
3.1. Introduzione	72
3.2. Materiali e Metodi	75
3.2.1. Soggetti	
3.2.2. Procedura	
3.2.3. Analisi dei dati	
3.3. Risultati	84
3.3.1. Andamento delle variazioni di sonnolenza soggettiva lungo le 40 ore	
3.3.2. Analisi statistica delle variazioni soggettive di sonnolenza in corrispondenza delle 4 sessioni sperimentali	
3.3.3. Analisi statistica delle variazioni comportamentali di sonnolenza in corrispondenza delle 4 sessioni sperimentali	
3.3.4. EEG di veglia	
3.3.5. Componenti precoci dei SEP	
3.3.6. Cambiamenti nella distribuzione dei voltaggi sullo scalpo in seguito a deprivazione di sonno	
3.3.7. Correlazione tra modificazioni dell'eccitabilità corticale e sonnolenza soggettiva e comportamentale	
3.3.8. Effetti del protocollo PAS	
3.4. Discussione	95
3.4.1. Modificazioni dell'EEG di veglia	
3.4.2. Variazioni d'ampiezza delle componenti precoci dei SEP	

3.4.3. Cambiamenti nella distribuzione topografica dei voltaggi associati ai SEP

3.4.4. Plasticità corticale dopo deprivazione di sonno

Conclusioni 100

Riferimenti bibliografici 102

INTRODUZIONE

La plasticità sinaptica è ritenuta essere uno dei principali meccanismi alla base del funzionamento della memoria. In particolare, il potenziamento a lungo termine (LTP), ovvero un rafforzamento delle connessioni sinaptiche, e la depressione a lungo termine (LTD), ovvero un indebolimento delle stesse, sono stati usati come modelli per esaminare il processo di consolidamento delle informazioni acquisite.

La scoperta del LTP risale agli anni '60. In quel periodo Lømo stava studiando nel laboratorio di Andersen gli effetti della stimolazione ripetitiva degli input assonali sulla scarica neuronale. Già Andersen *et al.* (1966) avevano dimostrato un incremento della scarica neuronale a livello dell'input della via perforante verso l'area dentata, in seguito a diversi secondi di stimolazione tetanica: al termine della stimolazione, si poteva osservare uno stato di aumentata eccitabilità delle cellule granulari per alcuni secondi. Lømo registrò i potenziali di campo nei dendriti e nei corpi cellulari dell'area dentata durante ripetitive stimolazioni della via perforante, alla ricerca di eventuali effetti postumi della stimolazione. In questo esperimento, treni di 120 impulsi a 12 Hz venivano inviati ogni 7 minuti, ad eccezione degli ultimi due treni, separati da 22 minuti. Per ogni treno, la seconda e la terza popolazione di *spike* in ogni scarica apparivano sempre più precoci. Inoltre, l'ampiezza del primo *spike* monosinaptico incrementava rapidamente verso un nuovo livello di potenziamento, mentre la sua latenza decresceva verso un livello basso ed apparentemente stabile. Andersen e Lømo (1967) ipotizzarono un possibile legame tra questo fenomeno e i processi di apprendimento, sostenendo che l'incremento dei potenziali depolarizzanti denotava un aumento dell'efficacia della trasmissione sinaptica osservabile al termine della stimolazione per un certo periodo (da diversi secondi a pochi minuti).

Questa durata era troppo breve per rendere conto dei cambiamenti plastici nel circuito neuronale che possono avvenire nei processi di apprendimento di alto livello; se questo fenomeno avveniva in un insieme di neuroni che formavano una catena polisinaptica, però, l'effetto individuale risultava notevolmente potenziato. Nel 1973 venne pubblicato uno studio di Bliss e Lømo nel quale si dimostrava un aumento di lunga durata dell'efficienza di trasmissione delle sinapsi delle cellule granulari dell'area dentata indotta da ripetuti treni di stimoli alla via perforante in topi anestetizzati. Ogni treno di stimoli risultava in un progressivo incremento nell'ampiezza della popolazione di *spike* delle cellule granulari nel lato tetanizzato, mentre non si osservava alcun potenziamento nel lato di controllo. L'aumento dei potenziali postsinaptici eccitatori in seguito all'applicazione di treni di stimoli ad alta frequenza venne definito dagli autori LTP.

In seguito a questo storico esperimento, gli studi sui meccanismi di plasticità sinaptica negli animali, sia *in vivo* che *in vitro*, sono aumentati nel corso del tempo, dando ulteriori conferme all'ipotesi relativa al coinvolgimento di tali meccanismi nei processi di apprendimento (Kandel, 1979; Rioult-Pedrotti *et al.*, 2000; Werk *et al.*, 2006, Smolen, 2007).

La plasticità sinaptica nell'umano è stata studiata prevalentemente tramite la stimolazione magnetica transcranica (TMS), una particolare tecnica di stimolazione cerebrale che prevede la trasmissione di un impulso magnetico sullo scalpo (Baker *et al.*, 1985) in grado di provocare dei cambiamenti plastici LTP-like nella corteccia motoria umana (Ziemann *et al.*, 1998b; 2002). In particolare, tra le varie modalità di utilizzo di tale tecnica, i risultati più promettenti sembrano arrivare dai paradigmi associativi (*paired associative stimulation*, PAS), consistenti nell'appaiamento di uno stimolo magnetico centrale (TMS) ed uno stimolo elettrico periferico (Ridding e Taylor, 2001; Stefan *et al.*, 2000). I vantaggi del protocollo PAS risiedono nella

possibilità di valutare, nell'uomo una particolare caratteristica del LTP, ovvero l'associatività (un LTP è possibile se il potenziale post-sinaptico eccitatorio provocato da un input debole è seguito, entro una breve finestra temporale, dal potenziale d'azione di un input forte; Bliss e Collingridge, 1993): tramite questa tecnica, infatti, è possibile modulare la temporizzazione degli eventi neuronali scatenati dagli stimoli appaiati, grazie alla possibilità di controllare l'intervallo temporale tra essi.

Recentemente è stata ipotizzata una relazione tra il sonno e la *downregulation* dei pesi sinaptici cerebrali (Tononi e Cirelli, 2003). Secondo tale ipotesi di "Omeostasi sinaptica", la veglia sarebbe associata ad un potenziamento sinaptico e ad un netto incremento della forza e dell'integrità della trasmissione sinaptica in numerosi circuiti cerebrali; al contrario, il sonno sarebbe associato ad una regolazione omeostatica (*downscaling*) dei pesi sinaptici neuronali. La procedura PAS è stata una delle tecniche maggiormente utilizzate allo scopo di valutare tale ipotesi (De Gennaro *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2008).

Lo scopo del presente lavoro è quello di analizzare il contributo dei paradigmi associativi di TMS nello studio della plasticità corticale nell'uomo, con una particolare attenzione all'utilizzo di tali procedure nello studio della relazione tra plasticità corticale e sonno. Nella prima parte, pertanto, verranno presi in considerazione i principali lavori che si sono avvalsi della TMS in generale, e del protocollo PAS in particolare, per lo studio della plasticità sinaptica nella corteccia motoria e somatosensoriale umana. Nella seconda parte, invece, verrà analizzata nel dettaglio l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica" e verranno illustrati alcuni degli studi che sembrano essere in accordo con tale ipotesi, in particolare quelli condotti per mezzo della procedura PAS. Infine, nell'ultima parte del presente contributo, verranno esposti i risultati di una ricerca condotta nell'ambito dell'ipotesi di "Omeostasi

sinaptica”, nella quale sono stati osservati gli effetti di una notte di deprivazione di sonno sull’efficacia del protocollo PAS.

CAPITOLO PRIMO

PARADIGMI ASSOCIATIVI DI TMS PER LO STUDIO DELLA PLASTICITA' CEREBRALE NELL'UOMO

1.1 La studio del Potenziamento a Lungo Termine (LTP) nell'umano con TMS

Uno dei metodi più utilizzati per lo studio della plasticità sinaptica nell'umano è la stimolazione magnetica transcranica (TMS), una tecnica di stimolazione cerebrale utilizzata fin dalla metà degli anni '80 (Barker *et al.*, 1985), che permette, in modo indolore e non-invasivo, di stimolare delimitate aree corticali. Tale tecnica è caratterizzata dalla trasmissione, tramite l'utilizzo di un *coil*, di un breve impulso magnetico sullo scalpo, in grado di produrre eccitazione o inibizione in un piccolo gruppo di neuroni corticali superficiali, sottostanti il *coil*.

Esistono diverse modalità di utilizzo della TMS:

- a) TMS ad impulso singolo: quando applicata sullo scalpo all'altezza della corteccia motoria primaria (M1) induce un potenziale evocato motorio (*motor evoked potentials* – MEP) che permette la valutazione di eccitabilità e conduttività delle vie motorie corticospinali;
- b) TMS a doppio impulso: uno stimolo condizionante sotto-soglia precede uno stimolo test sopra-soglia ad un determinato intervallo interstimolo (*interstimulus interval* – ISI); la modulazione dell'ampiezza dello stimolo test permette di indagare fenomeni di inibizione e facilitazione intracorticale

- c) TMS ripetitiva (rTMS): treno ripetitivo di impulsi a bassa (< 1 Hz) o alta (> 1 Hz) frequenza, che consente la modulazione dell'eccitabilità di un'area corticale che permane anche dopo la durata della stimolazione.

Il valore clinico della TMS risiede nella sua abilità nel rilevare deficit nel sistema motorio centrale. Recentemente, però, è stato preso in considerazione il possibile utilizzo di questa tecnica per usi più sofisticati, tramite l'applicazione contemporanea di tecniche di neuroimmagine. In particolare, sembra essere particolarmente significativo l'utilizzo della TMS in concomitanza con la registrazione elettroencefalografica (EEG), la quale permette lo studio degli effetti neuronali istantanei della TMS nel cervello, cosa che altre tecniche di *imaging* non sono in grado di fare (Komssi *et al.*, 2004). Studi sulla reattività corticale hanno mostrato che chiare risposte cerebrali sono elicitate anche ad un'intensità sotto-soglia, quando non è osservabile alcuna attività muscolare (Komssi *et al.*, 2004; Kahkonen *et al.*, 2005): ciò induce a pensare che la registrazione EEG sia un buon metodo per la valutazione dell'eccitabilità corticale. Per quanto riguarda la natura dell'attività EEG evocata dalla TMS, è stato osservato che la stimolazione magnetica della corteccia motoria induce un periodo di attività sincronizzata di tipo *beta* in prossimità del sito di stimolazione, effetto osservabile per alcune centinaia di ms (Paus *et al.*, 2001). Queste oscillazioni possono essere interpretate come una sincronizzazione transitoria dell'attività spontanea all'interno della banda *beta*, o come un'attivazione di neuroni inattivi, i quali iniziano ad oscillare in seguito alla stimolazione.

Tramite l'utilizzo combinato di TMS ed EEG è stata studiata la connettività corticocorticale: nel cervello a riposo viene stimolata una regione corticale e la diffusione dell'attività neuronale viene tracciata in base ai segnali EEG e/o la ricostruzione delle loro sorgenti. L'accoppiata TMS-EEG permette di mappare la connettività corticale, avendo come base la conoscenza implicita delle relazioni

causali tra le attivazioni evocate. La stimolazione delle regioni sensomotorie della corteccia, ad esempio, evoca un'attività in prossimità del *coil* entro 7 ms dallo stimolo (Komssi *et al.*, 2002). L'attività iniziale si diffonde nelle aree corticali circostanti così come alla corteccia controlaterale, riflettendo la connettività area-area del cervello. La connettività può essere valutata anche basandosi sulla latenza delle deflessioni EEG registrate sullo scalpo: ad esempio, è stata riportata una differenza di 1 ms nella latenza di una deflessione positiva di un potenziale tra gli elettrodi Fz e Cz, posti a 40 mm di distanza, dopo la stimolazione di un sito 20 mm più in alto dell'inion, dimostrando probabilmente la conduzione neuronale dalla corteccia visiva verso i campi oculari frontali (Iramina *et al.*, 2003). La possibilità di studiare la connettività corticale con TMS-EEG è stata valutata, inoltre, indagando se, spostando il *coil* da un sito di stimolazione ad un altro, si hanno degli effetti nella distribuzione dell'attività TMS-evocata nella corteccia controlaterale (Komssi *et al.*, 2002).

Anche la reattività corticale, intesa come la relazione tra l'intensità dello stimolo e la susseguente risposta, può essere indagata tramite l'utilizzo combinato di TMS ed EEG, valutando la dipendenza dell'attività EEG evocata tramite la TMS dal sito di stimolazione e dall'intensità. In questo modo, ad esempio, è stato osservato che la PFC ha un livello di reattività minore rispetto alla M1 (Kahkonen *et al.*, 2004).

Un recente studio relativo alle alterazioni nell'eccitabilità corticale legate al movimento ha dimostrato che la deflessione N100 evocata dalla TMS risulta attenuata quando la TMS della corteccia motoria è applicata subito prima dell'inizio di un movimento innescato visivamente, nonostante l'ampiezza dei potenziali evocati motori (MEP) nel muscolo *target* sono aumentati (Nikulin *et al.*, 2003). Ciò implica che la N100 può essere associata con l'attivazione di circuiti corticali inibitori.

Questo risultato dimostra il valore della registrazione EEG per la valutazione dell'eccitabilità corticale e nella differenziazione tra meccanismi corticali e spinali.

E' stato recentemente dimostrato che la stimolazione di muscoli o nervi periferici può indurre una riorganizzazione nella corteccia motoria (Hamdy *et al.*, 1998). Allo stesso tempo, è nota la capacità della TMS di modificare l'eccitabilità corticale per un periodo di tempo che va al di là della stimolazione. Ad esempio, la rappresentazione corticale dei muscoli innervati dal nervo ulnare aumenta in seguito a 2 ore di stimolazione magnetica di tale nervo (Ridding *et al.*, 2000). I paradigmi associativi di TMS si basano sostanzialmente sull'idea che la combinazione di una stimolazione periferica e della TMS possa indurre una riorganizzazione corticale in un breve periodo di tempo (McKay *et al.*, 2002; Stefan *et al.*, 2000). E' stato effettivamente dimostrato che, in seguito a questo tipo di doppia stimolazione, è osservabile un aumento della facilitazione intracorticale a breve intervallo (SICF), dato che suggerisce l'intervento di una forma di LTP (Ridding e Taylor 2001). Si viene così a creare una vera e propria riorganizzazione all'interno della corteccia motoria, tramite l'incremento dell'eccitabilità della proiezione corticospinale verso il muscolo stimolato (Ridding *et al.*, 2000) e l'aumento della rappresentazione corticale del muscolo stesso (McKay *et al.*, 2002; Ridding *et al.*, 2001). Ciò dimostra la natura dinamica dell'organizzazione della corteccia motoria ed il ruolo cruciale dell'input afferente nel modularla.

La maggior parte degli studi con protocolli associativi utilizzano tecniche che si avvalgono di treni brevi o continui di stimoli regolari verso diversi siti periferici e centrali. Alcune evidenze suggeriscono la possibilità di raffinare queste tecniche, ad esempio utilizzando input correlati (Clark *et al.*, 1988) e randomizzando l'intervallo tra le coppie di stimoli per evitare effetti di abitudine o adattamento (Godde *et al.*, 1996). Ridding e Uy (2003) hanno utilizzato la TMS per indagare questa possibilità

costruendo la curva di risposta allo stimolo prima e dopo un'ora di stimolazione simultanea di due punti motori dei rispettivi muscoli, ovvero il primo dorsale interosseo (FDI) e l'*abductor pollicis brevis* (APB). Il tempo trascorso tra successive coppie di stimoli era randomizzato tra 0,15 e 2,85 secondi. Questa stimolazione, detta "associativa", veniva confrontata con una situazione di controllo, non associativa, in cui i due stimoli non erano mai presentati contemporaneamente. Gli autori hanno riscontrato come dopo un ora di stimolazione appaiata dei punti motori dei muscoli FDI e APB si osserva un significativo incremento dell'eccitabilità della proiezione corticospinale verso i muscoli stimolati, che raggiunge i suoi massimi circa un'ora dopo il periodo di stimolazione. La stimolazione indipendente dei due muscoli *target*, invece, non comporta significativi cambiamenti nei livelli di eccitabilità della proiezione corticospinale verso i muscoli stessi. In uno studio di controllo venivano registrati i MEP prima e dopo un'ora di stimolazione associativa, tramite TMS e stimolazione elettrica transcranica (TES). E' stato così osservato che le risposte alla TMS erano significativamente facilitate in seguito al periodo di stimolazione associativa, ma non le risposte alla TES. E' probabile che la TMS attivi le cellule piramidali in modo transinaptico, mentre la TES le attivi direttamente. I differenti effetti sulle risposte a TMS e TES suggeriscono che il sito di cambiamento dell'eccitabilità giace all'interno della corteccia motoria.

In uno studio successivo, Pyndt e Ridding (2004) hanno cercato di comprendere il possibile meccanismo responsabile della riorganizzazione della corteccia motoria in seguito al paradigma di stimolazione afferente associativa testando l'inibizione intracorticale (ICI), la facilitazione intracorticale (ICF) e la SICF prima e dopo 60 minuti di stimolazione associativa dei punti motori dei muscoli FDI e APB. Gli autori hanno dimostrato che in seguito a tale stimolazione, come nello studio precedentemente descritto, era osservabile un aumento dell'eccitabilità delle

proiezioni corticospinali verso i muscoli stimolati, come evidenziato da un aumento dell'ampiezza dei MEP. Tale incremento dell'eccitabilità corticospinale era accompagnato da un aumento di ICF e SICF, mentre non vi erano cambiamenti significativi nel livello di ICI. L'incremento nel SICF era osservabile ad un intervallo interstimolo variabile tra i 2,3 e i 3,3 ms. Negli esseri umani, diverse condizioni possono risultare nella riorganizzazione della corteccia motoria: deafferentazione permanente (Cohen *et al.*, 1991a; Ridding e Rothwell, 1995) o temporanea (Brasil-Neto *et al.*, 1992; Ridding e Rothwell, 1995), apprendimento motorio (Pascual-Leone *et al.*, 1995), stimolazione di nervi periferici (Ridding *et al.*, 2000), oppure appaiamento di stimolazione centrale (TMS) con stimolazione di nervi periferici (Ridding e Taylor, 2001; Stefan *et al.*, 2000) o temporaneo blocco ischemico (Ziemann *et al.*, 1998a). I meccanismi alla base dell'incremento dell'eccitabilità corticale in seguito a questi interventi non sono completamente compresi. I dati qui riportati supportano l'ipotesi che meccanismi LTP-like siano responsabili dei cambiamenti nell'eccitabilità della corteccia motoria in seguito all'accoppiamento di una stimolazione centrale (TMS) ed una periferica. Prima di accettare questa ipotesi, però, è necessario dimostrare che la plasticità indotta dalla TMS condivide le proprietà principali del LTP come definito a livello cellulare nelle preparazioni animali. Un tipico LTP, infatti, può essere caratterizzato da quattro proprietà di base (Bliss e Collingridge, 1993):

- a) Cooperatività: la tetanizzazione di un debole input eccitatorio non è sufficiente per produrre un LTP, ma risulta in un LTP se la soglia per l'induzione viene abbassata, ad esempio tramite concomitante depolarizzazione della cellula *target*;

- b) Specificità: si può osservare un LTP solo lungo vie attivate dalla stimolazione, ma non in altre non attive durante la procedura di stimolazione;
- c) Associatività: anche se un debole input eccitatorio non è sufficiente per l'induzione di un LTP, quest'ultimo può essere osservato quando tale input sottosoglia viene accoppiato con un separato e forte input eccitatorio convergente. Un LTP è possibile solo se il potenziale post-sinaptico eccitatorio provocato dall'input debole è seguito, entro una breve finestra temporale (alcuni millisecondi) dal potenziale d'azione dell'input forte;
- d) Un LTP corticale, infine, richiede l'attivazione dei recettori NMDA.

Per poter sostenere che la TMS produce plasticità *LTP-like*, è necessario che i suoi effetti soddisfino tali requisiti.

Per quanto riguarda la cooperatività, Ziemann *et al.* (1998b) hanno osservato che la rTMS dell'area connessa con la rappresentazione del bicipite nella corteccia motoria a 0,1 Hz e ad un'intensità pari al 120% della soglia motoria a riposo non provoca cambiamenti nell'eccitabilità della corteccia motoria, mentre un blocco ischemico del nervo (INB) causa un moderato aumento dell'ampiezza dei MEP del bicipite, probabilmente dovuto ad un abbassamento del livello di GABA. Quando la rTMS veniva associata a INB si osservava un aumento dell'ampiezza dei MEP significativo e di lunga durata (>60 minuti). Inoltre, rTMS e INB, da sole, non avevano effetti sull'inibizione intracorticale a breve intervallo (SICI) e SICF, mentre, quando le due tecniche erano accoppiate, si osservava un significativo e duraturo (>60 minuti) decremento della SICI e un aumento della SICF. Questi dati potrebbero quindi dimostrare la presenza di cooperatività nella plasticità indotta da rTMS.

La caratteristica della specificità è stata indagata da Ziemann *et al.* (2002) nuovamente tramite l'utilizzo della rTMS in presenza di INB. La rTMS mirava a

stimolare alternativamente la rappresentazione di braccio, mano, faccia, gamba o braccio/mano nella corteccia motoria controlaterale al INB. Se la plasticità indotta dalla rTMS è dotata di specificità, ci si dovrebbe aspettare che un miglioramento della rappresentazione del braccio, valutato in termini di ampiezza dei MEP del bicipite, possa essere osservato solo se la rappresentazione del braccio viene effettivamente stimolata, ma non se vengono stimulate rappresentazioni corticali di altre parti del corpo. E' stato effettivamente osservato che la rTMS delle rappresentazioni di braccio e braccio/mano risultano in un significativo e duraturo (>40 minuti) incremento dell'ampiezza dei MEP nel bicipite. Al contrario, rTMS della rappresentazione di mano e faccia producono una significativa depressione del miglioramento di breve durata osservato nella condizione INB isolato. Infine, la rTMS della rappresentazione della gamba non differiva dalla condizione INB isolato. Questi dati sono quindi a favore della specificità della plasticità indotta da rTMS.

La caratteristica dell'associatività è stata invece studiata tramite in paradigmi associativi (PAS) di TMS (Stefan *et al.*, 2000; 2002). La stimolazione elettrica del nervo mediano all'altezza del polso era seguita da una stimolazione con TMS dell'area della mano nella corteccia motoria controlaterale. L'intensità della TMS veniva regolata in modo tale da produrre MEP di 1 mV nel APB a riposo quando la TMS veniva usata senza la stimolazione del nervo mediano. L'intervallo interstimolo tra la stimolazione del nervo mediano e la TMS era di 25 ms, approssimativamente il tempo necessario perché la stimolazione del nervo mediano raggiunga la corteccia motoria (quindi gli effetti delle due stimolazioni coincidevano). Novanta coppie di stimoli venivano inviate a 0,05 Hz in un periodo di 30 minuti. I cambiamenti nell'eccitabilità della corteccia motoria venivano valutati tramite la TMS applicata sull'area ottimale (*hotspot*) per la stimolazione del APB prima e dopo il protocollo PAS. In questo modo è stato possibile osservare che tale procedura provoca un

incremento nell'ampiezza dei MEP di circa il 50% rispetto al valore di *baseline*. Questo effetto durava più di 30 minuti ma meno di 24 ore, ed era estremamente specifico. Inoltre, l'incremento dell'ampiezza dei MEP dipendeva dall'intervallo interstimolo utilizzato (25 ms): se questo veniva aumentato (100, 525 e 5000 ms), non si osservava alcun effetto sull' ampiezza dei MEP; se veniva ridotto a 10 ms si osservava una sua diminuzione (Wolters *et al.*, 2003). Questi dati mostrano quindi che l'aumento dell'ampiezza dei MEP in seguito al paradigma PAS è una dimostrazione della caratteristica dell'associatività tipica della plasticità *LTP-like*, poiché l'ordine di arrivo degli stimoli convergenti sulla corteccia motoria è critico per poter osservare questo effetto.

Il possibile coinvolgimento dei recettori NMDA è stato infine valutato sia nella condizione rTMS-INB (Ziemann *et al.*, 1998c) sia tramite il paradigma PAS (Stefan *et al.*, 2002). Alcuni soggetti ingerivano una singola dose orale di 150 mg di dextrometorfano (DMO), un antagonista non-competitivo dei recettori NMDA, oppure un placebo, due ore prima della manipolazione sperimentale. Tale dose di DMO nel cervello umano è simile a quella che provoca il blocco dei recettori NMDA *in vitro* (Wong *et al.*, 1988). Nella condizione rTMS-INB, il DMO non aveva effetti significativi sull'ampiezza dei MEP, ma preveniva il duraturo decremento della SICI. Nella condizione PAS, il DMO preveniva l'incremento dell'ampiezza dei MEP, ed era in grado di provocare una riduzione della stessa. Ciò sembra compatibile con l'idea che l'attivazione dei recettori NMDA sia necessaria per indurre un'aumento dell'ampiezza dei MEP in seguito a protocolli associativi. Nel complesso, questi dati mostrano che la plasticità indotta dalla TMS condivide le caratteristiche tipiche del LTP osservato *in vitro*. Ciò legittima l'utilizzo della TMS e dei paradigmi associativi per lo studio dei fenomeni LTP- e LTD-*like* nella corteccia motoria umana.

E' interessante considerare il possibili effetti degli studi sulla plasticità corticale provocata da TMS a livello riabilitativo. Alcuni studi, ad esempio, hanno mostrato che la TMS ad impulso singolo dell'area M1 controlaterale, provoca un aumento dell'ampiezza dei MEP dei muscoli che agiscono come "*prime movers*" nel programma motorio, quando venivano immaginati i movimenti del polso (Rossi *et al.*, 1998; Fadiga *et al.*, 1999) o più fini movimenti della mano (Rossini *et al.*, 1999). Questi effetti di facilitazione corticospinale, dotati di specificità emisferica, indicano che l'*imagery* motoria può indurre adattamenti sinaptici *online* della M1, connessi con cambiamenti nei *pattern* di rappresentazione dell'*output* (Sanes e Donoghue, 2000), i quali possono essere monitorati dalla TMS. Le conseguenze comportamentali di questi dati possono essere rilevanti a livello riabilitativo: l'*imagery* motoria potrebbe provocare una sorta di "consolidamento motorio" anche in assenza di un vero e proprio *training* motorio. Altri studi hanno dimostrato che l'applicazione della rTMS a 1 Hz (nota per provocare effetti inibitori nella regione stimolata) sulla M1 dopo l'apprendimento di un semplice compito motorio, provoca difficoltà nella successiva esecuzione del compito stesso (Muellbacher *et al.*, 2002). Al contrario, quando una TMS ad impulso singolo veniva applicata sull'area M1 controlaterale contemporaneamente con movimenti specifici e volontari del pollice, la codifica della sequenza motoria era facilitata e più duratura rispetto al *training* motorio senza TMS (Butefisch *et al.*, 2004). Le implicazioni riabilitative di questi risultati sono date dal fatto che la codifica di un compito motorio può essere migliorata dal concomitante uso della TMS. Anche l'inibizione provocata dalla rTMS a bassa frequenza potrebbe avere degli effetti terapeutici, ad esempio controllando attività motorie involontarie ed eccessive dovute ad una ipereccitabilità delle aree motorie (Siebner *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2004; Brambilla *et al.*, 2003).

Alcuni autori hanno indagato la stretta connessione anatomo-funzionale dell'area motoria supplementare (SMA) con le strutture limbiche, ipotizzando che la SMA abbia un ruolo centrale nell'innescare di movimenti in risposta a stimoli carichi emotivamente (Damasio, 1997). Una stimolazione con TMS sulla SMA precedeva uno stimolo test sulla M1 nel contesto di atti motori visivamente guidati innescati da stimoli emotivamente carichi o neutri (Olivieri *et al.*, 2003). La stimolazione della SMA aumentava l'eccitabilità di M1 in presenza di stimoli emotivi, al contrario della stimolazione della M1 senza stimolazione della SMA, o della stimolazione della SMA in presenza di stimoli neutri. La SMA, quindi, sembra essere una sorta di interfaccia tra aree motorie e limbiche per il processamento di stimoli emotivamente carichi per l'innescare di atti motori. Quindi, stimoli visivi a forte impatto emotivo potrebbero essere più efficaci di stimoli neutri durante la riabilitazione di soggetti con disfunzioni del tratto corticospinale.

Recenti ricerche si sono incentrate sull'utilizzo della TMS sulle aree somatosensoriali (Cohen *et al.*, 1991b; Seyal *et al.*, 1995). E' stato osservato che la TMS ad impulso singolo della corteccia parietale destra, 20-40 ms dopo stimolazione bimanuale, interferisce con la detezione di stimoli tattili contro- e ipsilaterali alle dita, mentre TMS ad impulso singolo della corteccia parietale destra 50 ms prima della stimolazione tattile destra risulta in un incremento della sensibilità allo stimolo ipsilaterale. Ciò suggerisce una disinibizione (indotta dalla TMS) della corteccia parietale sinistra in seguito alla stimolazione della corteccia parietale destra (Olivieri *et al.*, 1999a). E' interessante osservare che la rTMS sul lobo parietale posteriore destro e occipitale ventrale destro producono neglect visivo simile a quello dei pazienti con lesioni dell'emisfero destro (Bjoertomt *et al.*, 2002). La TMS dell'emisfero sinistro facilita selettivamente le risposte a *target* visivi nell'emicampo destro, mentre la stessa stimolazione nell'emisfero destro produce effetti bilaterali

(Grosbras e Paus, 2002). Questi dati suggeriscono che la rappresentazione degli emispazi contro- e ipsilaterali è maggiore nell'emisfero destro. Studi su pazienti con lesioni all'emisfero destro in seguito ad ictus sono stati portati avanti per valutare il possibile ruolo modulatore che può avere la TMS nella condizione clinica nota come "estinzione", un fallimento nella percezione di stimoli sensoriali controlesionali solo quando questi stimoli sono presentati insieme ad altri stimoli ipsilesionali (Olivieri *et al.*, 1999b). E' stato osservato che, in questi soggetti, la TMS a doppio impulso del lobo frontale sinistro ristabilisce la distribuzione dell'attenzione al lato controlesionale, riducendo transitoriamente il fenomeno dell'estinzione. Questa procedura, quindi potrebbe essere proposta sia come test per prognosticare il recupero, sia come tecnica riabilitativa (Olivieri *et al.*, 2001; Brighina *et al.*, 2003).

E' doveroso ricordare, infine, che diversi autori si stanno attualmente occupando del possibile ruolo della plasticità corticale indotta dalla TMS in ambiti quali il ragionamento, la memoria e altre attività cognitive (Rossi *et al.*, 2001; Sandrini *et al.*, 2003; Rami *et al.*, 2003), nonché il possibile utilizzo di questa tecnica nella riabilitazione di diversi disturbi psichiatrici (Post e Keck, 2001; Tamura *et al.*, 2004).

Tsuji e Rothwell (2002) sostengono che, per considerare la rTMS come uno strumento utile durante la riabilitazione, è necessario dimostrare che questa tecnica produce non solo degli effetti sui MEP, ma anche degli effetti comportamentali. I dati relativi ai soggetti sani su questo argomento, però, sono abbastanza contrastanti (Borojerdi *et al.*, 2000; Schlaghecken *et al.*, 2001). Uno dei problemi presenti nel tentativo di identificare effetti motori fisiologici della rTMS in soggetti sani è l'intrinseca variabilità dei movimenti volontari. Tsuji e Rothwell, quindi, hanno cercato di superare questo ostacolo usando come oggetto di studio un riflesso, ovvero il riflesso di stiramento a lunga latenza del *flexor pollicis longus* (FPL), per testare gli effetti della rTMS sul comportamento motorio. Inoltre, veniva valutato l'effetto

della rTMS sui MEP e di una stimolazione elettrica sui SEP nel muscolo FDI. Gli autori hanno dimostrato che 25 minuti di TMS a 1 Hz e al 95% della soglia motoria a riposo, applicata sulla corteccia motoria, sopprime i MEP nel FDI per 20 minuti, mentre l'ampiezza dei MEP aumentava dopo 30 minuti di rTMS a 0.1 Hz appaiata con la stimolazione del punto motorio di FDI. Inoltre, i SEP aumentavano dopo 10-30 minuti di rTMS a 0.1 Hz appaiata con la stimolazione del punto motorio. Infine, l'ampiezza del riflesso di stiramento transcorticale nel muscolo FPL è modulata nella stessa direzione e con un simile decorso temporale rispetto ai SEP ed ai MEP, mentre non c'erano effetti sul riflesso di stiramento spinale. Gli autori sono quindi arrivati alla conclusione che il condizionamento con rTMS può avere degli effetti sul processamento di "naturali" input psicofisiologici. E' teoricamente possibile, quindi, che tale procedura possa produrre anche degli effetti comportamentali sul movimento volontario (Schlaghecken *et al.*, 2001).

1.2 Modificazioni plastiche nella corteccia motoria

La maggior parte degli studi che hanno indagato l'induzione di meccanismi di plasticità sinaptica tramite il paradigma PAS hanno preso in considerazione gli effetti sulla corteccia motoria. Come abbiamo visto, Stefan *et al.* (2000) hanno dimostrato che la stimolazione appaiata del nervo mediano all'altezza del polso e, tramite TMS, dell'area della mano nella corteccia motoria controlaterale per un periodo di 30 minuti provoca un aumento dei MEP in APB, quando l'ISI è di 25 ms. I cambiamenti plastici osservati in questo studio sembrano essere di origine corticale, poichè l'eccitabilità di una porzione di motoneuroni- α , valutata in termini di grandezza dell'onda F elicitata dalla stimolazione del nervo mediano, rimane invariata in presenza di un significativo aumento dei MEP indotti dalla TMS. La plasticità provocata da questa metodica possiede le caratteristiche tipiche di un LTP

associativo: essa evolve rapidamente (sono necessari appena 30 minuti di stimolazione oppure 90 coppie di stimoli), è persistente (dura per un minimo di 30-60 minuti, escludendo il possibile coinvolgimento di fenomeni *STP-like*), è reversibile dopo 24 ore e dipende dalla contingenza temporale dei due stimoli (se l'ISI veniva aumentato oltre i 25 ms non vi erano modificazioni nell'ampiezza dei MEP; se veniva diminuito a 10 ms si osservava una diminuzione dell'ampiezza dei MEP). La durata del periodo silente, per definizione registrato in condizioni di attività, è stata prolungata dal protocollo PAS. Ciò dimostrerebbe che la TMS attiva circuiti intracorticali attivi anche durante i movimenti volontari. Questi risultati, nel complesso, sono coerenti con l'assunzione che il paradigma PAS provoca dei fenomeni *LTP-like* nella corteccia motoria umana. Inoltre, viene sottolineata l'importanza delle afferenze somatosensoriali per la plasticità corticale motoria. Il fatto che riducendo l'ISI a 10 ms si osservi una riduzione dell'ampiezza dei MEP, al contrario di quanto avviene quando l'ISI è di 25 ms, porta a pensare che la plasticità associativa nella corteccia motoria umana sia governata da una rigida regola temporale (Walters *et al.*, 2003), la stessa che sarebbe alla base dei meccanismi di plasticità associativa descritti nel modello "classico" di Hebb (1949). Questi effetti portano Stefan *et al.* (2000) ad ipotizzare che la plasticità indotta dal PAS sia dovuta ad un incremento dell'efficacia sinaptica: questa ipotesi è supportata dall'osservazione che l'inibizione intracorticale mediata dai recettori per il GABA_A rimane invariata in seguito al PAS, mentre il dextrometorfano, che blocca i recettori NMDA non competitivi (Wong *et al.*, 1988), arresta gli effetti del PAS sull'ampiezza dei MEP (Stefan *et al.*, 2002). Ciò suggerisce che l'attivazione dei recettori NMDA sia un passaggio necessario nella plasticità indotta dal PAS. E' bene ricordare, però, che la plasticità corticale è impedita quando un *training* motorio viene portato avanti sotto l'effetto del lorazepam, un farmaco in grado di rinforzare il funzionamento dei

recettori GABA_A (Buttfeisch *et al.*, 2000). Ciò suggerisce che sostanze come le benzodiazepine prevengono la riorganizzazione corticale intaccando la capacità delle afferenze corticali di indurre una disinibizione transitoria. Una forte inibizione locale, quindi, sarebbe in grado di ridurre la capacità dei neuroni locali di generare LTP.

Ziemann *et al.* (2004) hanno cercato di valutare il ruolo dell'inibizione mediata dal GABA nella plasticità indotta dalla pratica. In un primo esperimento, gli autori hanno cercato di comprendere se gli effetti della pratica motoria sono rafforzati se tale pratica viene portata avanti durante disinibizione della corteccia motoria. Per fare ciò, sono state confrontate diverse procedure sperimentali: INB da sola per indurre la disinibizione della corteccia motoria; pratica motoria da sola (MP); MP durante INB; stimolazione elettrica (ES) del bicipite durante INB; PAS sul gomito durante INB. In un secondo esperimento, gli autori hanno testato l'ipotesi che la plasticità pratica-dipendente possa essere depressa se la pratica motoria viene eseguita durante un aumento dell'inibizione corticale. Per fare ciò sono state messe a confronto due condizioni: nella prima i soggetti eseguivano MP durante INB dopo trattamento con una singola dose orale di 2 mg di lorazepam (agonista dei recettori GABA_B); nella seconda la stessa procedura sperimentale veniva eseguita dopo trattamento con un placebo. Nel complesso, i risultati di questo studio hanno dimostrato che la INB rinforza la plasticità pratica-dipendente della corteccia motoria umana, mentre il trattamento con lorazepam provoca una sua depressione. È stato dimostrato che la deafferentazione di un arto provoca un rapido decremento del GABA nella corteccia sensomotoria controlaterale alla INB (Levy *et al.*, 1999). Questo effetto diviene significativo 0-10 minuti prima dell'ottenimento del completo blocco ischemico del nervo motorio, e ciò ricalca lo stesso decorso temporale del cambiamento dell'ampiezza dei MEP nel bicipite (Ridding e Rothwell, 1997). Il

meccanismo alla base del rapido decremento del livello del GABA non è stato ancora compreso, anche se è stata suggerita una rapida modulazione dell'attività di GABA transaminasi (GABA-T). La plasticità sinaptica nella corteccia motoria sembrerebbe dipendere dall'inibizione connessa con il GABA. Studi sulla corteccia motoria dei ratti hanno dimostrato che l'induzione di LTP tramite microstimolazione elettrica ripetitiva richiedeva una riduzione dell'inibizione corticale locale tramite l'applicazione della bicucullina, un antagonista dei recettori GABA_A (Hess e Donoghue, 1994; Hess *et al.*, 1996). Al contrario, il lavoro di Ziemann *et al.* (2004) mostra come sia possibile un passaggio da un incremento ad un decremento nel PPE come conseguenza del trattamento con lorazepam. Questi dati, nel complesso, indicano un ruolo importante dell'inibizione corticale mediata dal GABA nel modulare in modo bidirezionale la plasticità pratica-dipendente nella corteccia motoria umana.

McDonnell *et al.* (2007) hanno osservato che una singola dose orale di baclofen (BAC), uno specifico agonista dei recettori GABA_B, può ridurre la plasticità LTP-*like* nella corteccia motoria umana. L'attivazione farmacologica dei recettori GABA_B ha due effetti principali: rafforzamento dei potenziali postsinaptici inibitori mediati da recettori GABA_B nelle cellule piramidali e riduzione dell'inibizione mediata dai recettori GABA_A tramite autoinibizione presinaptica degli interneuroni inibitori. Mentre il primo effetto iperpolarizza le cellule piramidali *target* e neutralizza l'induzione del LTP, il secondo porta a depolarizzazione delle cellule piramidali *target* facilitando l'induzione del LTP. Le conseguenze su direzione e ampiezza dei meccanismi di plasticità sinaptica mediati dai recettori GABA_B dipenderanno da quale dei due effetti prevarrà (Staubli *et al.*, 1999). Nella corteccia motoria umana la somministrazione del BAC sembra portare ad una soppressione della plasticità LTP-*like*. Sembra esserci, inoltre, un aumento dell'inibizione intracorticale a lungo

intervallo (LICI), una misura dei potenziali postsinaptici inibitori mediati dai recettori GABA_B, ed un decremento del SICI, una misura dell'inibizione mediata dai recettori GABA_A. L'incremento del LICI sembrerebbe prevalere sul decremento del SICI determinando la soppressione della plasticità *LTP-like*. Le conseguenze della somministrazione del BAC sulla plasticità sarebbero dovute agli effetti di tale farmaco sui processi inibitori direttamente nella corteccia motoria, e non da modificazioni del segnale afferente nel sistema somatosensoriale (Soto *et al.*, 2006; Kofler *et al.*, 1992). Questi risultati suggeriscono che l'utilizzo del BAC potrebbe avere degli effetti negativi sull'apprendimento motorio umano, ma sono necessarie ulteriori indagini.

Diversi studi hanno riportato una notevole variabilità interindividuale al protocollo PAS (Stefan *et al.*, 2000; Stinear e Hornby, 2005; Bagnato *et al.*, 2006; Fratello *et al.*, 2006). Si è ritenuto necessario, quindi, indagare quali fattori possono influenzare la plasticità associativa della corteccia motoria. Stefan *et al.* (2004) hanno preso in considerazione l'importanza dell'attenzione nei processi di plasticità corticale tramite l'utilizzo del paradigma PAS: gli autori hanno dimostrato che, in seguito a contemporanea stimolazione elettrica del nervo mediano e magnetica (TMS) su *hotspot* per l'attivazione dell'APB, non si osservava alcun effetto sull'ampiezza dei MEP quando l'attenzione dei soggetti era rivolta alla mano non stimolata oppure quando, durante la stimolazione, veniva chiesto ai soggetti di risolvere alcuni compiti aritmetici. Se, al contrario, i soggetti focalizzavano la loro attenzione sulla mano stimolata, si osservava un aumento dei MEP. Tale aumento era maggiore se ai soggetti veniva chiesto anche di guardare la mano *target*. Ciò dimostra non solo l'importanza dell'attenzione nei meccanismi di plasticità corticale, ma anche che la modulazione di tale plasticità da parte dell'attenzione non è un fenomeno tutto-o-nulla, bensì si trova su un *continuum*. Ulteriori conferme

dell'influenza dell'attenzione sui fenomeni di plasticità in corteccia motoria indotti sperimentalmente vengono da un recente studio di Kamke *et al.* (2012). In questo lavoro venivano indotti meccanismi di tipo LTP-like in corteccia motoria tramite due diverse modalità di utilizzo della TMS: il protocollo PAS e la stimolazione *theta-burst* intermittente (*intermittent theta-burst stimulation* – iTBS), un tipo di rTMS in grado di indurre modificazioni della plasticità corticale tramite brevi *burst* di stimoli ad alta frequenza (50 Hz) e bassa intensità (Huang *et al.*, 2005). L'influenza dell'attenzione veniva valutata chiedendo ai soggetti di eseguire, durante ciascuno dei protocolli di TMS, un compito di detezione visiva con basso o alto carico attentivo. I risultati indicavano che i cambiamenti plastici indotti dai due protocolli di TMS in corteccia motoria erano osservabili solo in concomitanza del compito a basso carico attentivo e non in presenza del compito ad alto carico attentivo, a dimostrazione che l'attenzione può essere un potente modulatore dei meccanismi di plasticità corticale.

Rosenkranz e Rothwell (2006) hanno dimostrato che anche il tipo di procedura sperimentale utilizzata influenza in modo diverso la plasticità corticale. Gli autori hanno confrontato gli effetti su alcuni parametri di eccitabilità motoria a riposo (MEP e SICI) e sull'organizzazione sensomotoria di tre protocolli in grado di modulare la plasticità corticale: il protocollo PAS, la pratica motoria consistente in rapide abduzioni del pollice e la produzione di *input* sensoriali da parte di una vibrazione muscolare semicontinua. I risultati confermano che queste tre tecniche sono in grado di influenzare l'eccitabilità corticale, ma mostrano anche che ognuna di esse ha effetti diversi sui parametri presi in considerazione. In particolare, il protocollo PAS provoca un incremento dell'ampiezza dei MEP nel muscolo *target*, ma non ha effetti sulla SICI e sull'organizzazione sensomotoria, la pratica motoria è in grado di aumentare l'ampiezza dei MEP e tende a ridurre la SICI e ad alterare

l'organizzazione sensomotora, mentre la vibrazione muscolare semicontinua non provoca cambiamenti nei MEP e nella SICI ma altera l'organizzazione sensomotora. Per spiegare questi dati gli autori ipotizzano che protocolli che enfatizzano lo stadio di *output* della corteccia motoria attivandola direttamente come il movimento volontario, il PAS e la pratica motoria hanno maggiori possibilità di provocare cambiamenti nell'eccitabilità delle connessioni di *output* e quindi nei MEP. Al contrario, protocolli che enfatizzano gli *input* sensoriali (vibratori) hanno maggiori possibilità di provocare cambiamenti nella risposta della corteccia motoria agli input afferenti. Infine, protocolli in cui vi è un mix di attivazione di *output* motori e *input* sensoriali, come nel caso della pratica motoria, possono influenzare sia l'ampiezza dei MEP che l'organizzazione sensomotora.

Anche diversi protocolli PAS hanno differenti risultati sull'eccitabilità corticale. Sale *et al.* (2007) hanno osservato che, mentre un protocollo PAS breve (132 coppie di stimoli a 0,2 Hz per circa 11 minuti) induce un incremento dell'ampiezza dei MEP di circa il 51%, un protocollo PAS lungo (90 coppie di stimoli a 0,05 Hz per circa 30 minuti) produce un piccolo e non significativo aumento dell'ampiezza dei MEP (11%). Un risultato molto interessante derivante da questo studio è che entrambi i protocolli PAS inducevano una maggiore facilitazione dei MEP quando le sessioni sperimentali venivano condotte nel pomeriggio. Non è chiaro il perché di questo risultato, ma è stato ipotizzato l'intervento del ritmo circadiano endogeno, in particolare potrebbero essere implicate le variazioni circadiane dei livelli di cortisolo. Nello stesso studio si è cercato di comprendere quali fattori neurofisiologici influenzano l'efficacia del PAS. Non è stata osservata alcuna relazione significativa tra gli effetti del PAS e alcune variabili neurofisiologiche come SICI pre-PAS, ICF pre-PAS, soglia motoria a riposo (RMT) pre-PAS e soglia motoria in attività (AMT)

pre-PAS, mentre si osserva un incremento della durata del periodo silente corticale in seguito al PAS.

Tra i fattori che possono essere alla base dell'elevata variabilità interindividuale in seguito al protocollo PAS è stato considerato anche il polimorfismo genetico dei segnali neurali coinvolti nella plasticità sinaptica: è interessante l'ipotesi che il polimorfismo di segnali neurali chiave per la plasticità sinaptica sia anche associato con le principali variazioni della plasticità della corteccia motoria indotta dal PAS tra i soggetti. Ciò sarebbe in linea con i dati di Muller-Dahlhaus *et al.* (2008), secondo i quali i soggetti che rispondono al PAS mostrano una maggiore eccitabilità della corteccia motoria rispetto a coloro che non rispondono. Rosenkranz *et al.* (2007), hanno osservato, invece, che nei musicisti eccitabilità e plasticità della corteccia motoria sono caratterizzate da un maggior guadagno rispetto ai non-musicisti. Poiché questo risultato dipende dall'età in cui ha avuto inizio l'apprendimento dell'uso dello strumento musicale, gli autori ipotizzano che le misure dell'eccitabilità della corteccia motoria possono riflettere adattamenti neurali alla pratica musicale portata avanti per lungo tempo (ad es. incremento del numero e della modificabilità delle sinapsi). E' possibile, perciò, che coloro che rispondono positivamente al PAS e coloro che non rispondono o rispondono negativamente siano caratterizzati da differenze anatomiche e fisiologiche, in parte conseguenza di tratti endofenotipici, in parte conseguenza della plasticità neurale indotta dall'esperienza. Diversi studi (Fathi *et al.*, 2010; Muller-Dahlhaus *et al.*, 2008; Tecchio *et al.*, 2008) hanno inoltre dimostrato che l'ampiezza della plasticità corticale indotta dal PAS in corteccia motoria decresce con l'età. Vi sono diverse evidenze relative alla dipendenza dall'età di altre forme di plasticità della corteccia motoria (Sawaki *et al.*, 2003; Ward *et al.* 2007). Questo declino nelle *performance* motorie può essere dovuto ad una ridotta capacità di modulare appropriatamente l'attività nelle reti corticali (Ward *et al.*,

2007). E' importante notare, comunque, che non sembra esserci un effetto dell'età sulla RMT (Wassermann 2002; Pitcher *et al.*, 2003; Muller-Dahlhus *et al.*, 2008), perciò variazioni dell'eccitabilità della corteccia motoria, da sole, non spiegano il declino con l'età della plasticità indotta dal PAS. Diversi meccanismi connessi col normale invecchiamento possono rendere conto di questo fenomeno, come la riduzione della concentrazione cerebrale di diversi neurotrasmettitori connessi con i meccanismi di plasticità corticale (Jay 2003; Floel *et al.*, 2005) o il relativo decremento nell'eccitabilità dei circuiti inibitori in M1 (Peinemann *et al.*, 2001).

L'apprendimento può alterare rapidamente l'organizzazione dell'*output* in M1 negli esseri umani adulti (Pascual-Leone *et al.*, 1995; Classen *et al.*, 1998; Liepert *et al.*, 1999; Muellbacher *et al.*, 2001, 2002), primati non umani (Nudo *et al.*, 1996) e roditori (Kleim *et al.*, 1998). E' stato ipotizzato che LTP e LTD siano importanti meccanismi nella plasticità corticale indotta dall'apprendimento (Donoghue *et al.*, 1996; Sanes e Donoghue, 2000). Da alcuni studi è emerso che nei topi l'apprendimento motorio provoca un'inibizione di successivi LTP, mentre si osserva un incremento della LTD (Riout-Pedotti *et al.*, 1998, 2000). Ziemann *et al.* (2004) hanno testato l'ipotesi che tale relazione fosse osservabile anche negli esseri umani, inducendo plasticità LTP- ed LTD-like in M1 tramite il protocollo PAS. L'ISI era equivalente alla latenza della N20 individuale del potenziale somatosensoriale corticale evocato del nervo mediano per indurre LTP, mentre per provocare LTD era equivalente alla latenza della N20 -5 ms. L'apprendimento motorio era rappresentato da movimenti di abduzione del pollice della mano destra ripetuti il più rapidamente possibile. L'apprendimento motorio risultava in un rapido incremento del picco massimo di rapidità di esecuzione dei movimenti di abduzione del pollice, associato ad un aumento dell'ampiezza dei MEP in APB. I dati relativi a questo studio dimostrano che l'apprendimento motorio previene la successiva induzione di

plasticità *LTP-like*, mentre favorisce l'induzione di plasticità *LTD-like*. Queste interazioni tra la pratica motoria e la plasticità indotta dal PAS erano specificatamente associate all'apprendimento motorio, poiché non si osservavano quando il PAS era preceduto dalla stessa quantità di un differente tipo di pratica motoria che non provocava apprendimento motorio. Risultati simili sono stati ottenuti anche in studi che, al posto di un *training* motorio ballistico, ne utilizzavano uno di tipo dinamico (Stefan *et al.*, 2006). Rioult-Pedrotti *et al.* (1998, 2000) spiegano questa relazione tra apprendimento motorio e plasticità corticale ipotizzando che l'apprendimento motorio rafforzi le connessioni sinaptiche all'interno di un *range* di saturazione, precludendo quindi un'ulteriore induzione di LTP. Alternativamente, è possibile spiegare questi risultati tramite la teoria di Bienestock-Cooper-Munro (BCM) della plasticità sinaptica bidirezionale, la quale sostiene che la soglia per l'induzione di LTP/D si sposta in funzione della storia di attività corticale (Bienestock *et al.*, 1982; Artola *et al.*, 1990; Bear e Kirkwood, 1996). Se il LTP è stato coinvolto in un processo di apprendimento, la teoria Bienestock-Cooper-Munro (BCM) prevede un incremento della soglia per una successiva induzione di LTP e, allo stesso tempo, un decremento della soglia per l'induzione di LTD. Quindi, la probabilità di avere successo nell'induzione di LTD aumenta in seguito ad un recente LTP. Muller *et al.* (2007) hanno studiato questa forma di plasticità omeostatica esaminando l'interazione tra due consecutive sessioni di PAS. La prima sessione di PAS poteva mirare ad indurre plasticità *LTP-like* (ISI = latenza N20 + 2 ms), *LTD-like* (ISI = latenza N20 - 5 ms) o nessun cambiamento (condizione di controllo con alternanza *random* tra i precedenti intervalli) in APB. La seconda sessione di PAS, 30 minuti dopo la prima, mirava sempre ad indurre LTP. Anche i risultati derivanti da questo studio dimostrano che gli effetti del PAS sull'eccitabilità di M1 dipende criticamente dalla recente storia di attività neuronale

in M1, e sono in accordo con la teoria BCM. Infatti, se la seconda sessione di PAS era preceduta da LTD o dalla condizione di controllo, essa produceva un incremento dell'ampiezza dei MEP, mentre tale effetto era totalmente soppresso se la seconda sessione era preceduta da LTP. Questo studio, rispetto a quelli che lo hanno preceduto, ha permesso di indagare l'interazione tra due identiche manipolazioni sperimentali. I risultati osservati in questo lavoro, dunque, permettono di sostenere con maggior convinzione che i meccanismi di plasticità omeostatica avvengono nelle stesse connessioni sinaptiche entro un dato circuito neurale. M1 è coinvolta nell'apprendimento motorio (Muellbacher *et al.*, 2001) ed è fondamentale nello stadio precoce del consolidamento di abilità dei movimenti delle dita recentemente acquisite (Muellbacher *et al.*, 2002). L'apprendimento di un'abilità motoria interferisce col successivo apprendimento di una seconda abilità simile alla prima (Shadmehr e Brashers-Krug, 1997) ed il sito di tale interferenza si trova all'interno di M1 (Cothros *et al.*, 2006). I dati a favore di una metaplasticità omeostatica "omosinaptica-like" in M1 potrebbero rendere conto per questi effetti di interazione: l'apprendimento di un'abilità motoria modificherebbe la soglia di induzione di LTP/LTD in accordo con la teoria BCM, elevando la soglia per l'induzione di LTP ed abbassando quella per l'induzione di LTD. Di conseguenza, l'acquisizione di una seconda abilità motoria, che necessita dell'attivazione degli stessi circuiti neurali, sarà più difficoltosa. Un recente studio, inoltre, ha dimostrato che non solo la precedente attività motoria (movimenti del pollice) ma anche l'osservazione in video del medesimo movimento eseguito da un altro individuo è in grado di prevenire il successivo manifestarsi di modificazioni plastiche di tipo LTP-like, valutate in termini di incremento d'ampiezza dei MEP in seguito al protocollo PAS (Lepage *et al.*, 2012). Al contrario, l'osservazione in video dei movimenti di un punto che riproducevano fedelmente i movimenti del pollice non influenzava la plasticità

corticale: il PAS effettuato successivamente provocava l'atteso effetto di incremento dell'ampiezza dei MEP. Un limite di questo lavoro, comunque, è dato dal fatto che erano presenti differenze di eccitabilità corticale in *baseline* tra il gruppo che effettuava il movimento del pollice ed il gruppo che osservava il movimento in video. Nonostante ciò, l'eccitabilità corticale nella baseline del gruppo che osservava il movimento del pollice e quella del gruppo che osservava i movimenti del punto erano simili; pertanto la differenza sugli effetti opposti sulle successive modificazioni plastiche osservate nei due gruppi può essere considerata attendibile.

Anomalie nei meccanismi di plasticità sinaptica possono giocare un ruolo in diversi disturbi neurologici. Le distonie focali compito-specifiche della mano si osservano solitamente in persone costrette a portare avanti movimenti ripetitivi (ad es., i musicisti). Sebbene le prime manifestazioni di una distonia di questo tipo sono anomalie del funzionamento motorio, recenti evidenze portano a pensare ad una disfunzione del processamento sensoriale a livello centrale (Tempel e Perlmutter, 1990; Odergren *et al.*, 1996; Tinazzi *et al.*, 2000; Abbruzzese *et al.*, 2001; Sanger *et al.*, 2002; Tamburin *et al.*, 2002). Quartarone *et al.* (2003) hanno utilizzato il protocollo PAS per valutare la plasticità associativa nell'area motoria primaria della mano in 10 pazienti con crampo dello scrittore, una distonia caratterizzata da eccessiva attivazione muscolare durante la scrittura (Marsden e Sheehy, 1990) ed in 10 soggetti di controllo. In entrambi i gruppi, prima e dopo l'applicazione del protocollo PAS, vennero valutate soglia motoria a riposo ed in attività, ampiezza media dei MEP, SICI e periodo silente corticale. In entrambi i gruppi il PAS provocava un incremento dell'ampiezza dei MEP a riposo, maggiormente pronunciato nel APB destro. Tale facilitazione dell'ampiezza dei MEP era maggiore nei pazienti piuttosto che nei soggetti di controllo. Inoltre, solo i pazienti mostravano un decremento della soglia motoria a riposo ed in attività dopo la stimolazione. In

entrambi i gruppi la procedura PAS induceva un prolungamento del periodo silente corticale in APB e FDI, significativo solo in APB nei soggetti sani. Non vi erano effetti sulla SICI in nessuno dei due gruppi. Questi dati portano ad alcune riflessioni sulla patofisiologia della distonia compito-specifica della mano. Il *pattern* di cambiamento dell'eccitabilità osservato suggerisce che una ripetitiva stimolazione sensoriale periferica della mano in soggetti con crampo dello scrittore può scatenare plasticità anomala nell'area motoria primaria della mano. E' possibile ipotizzare, dunque, che la ripetitiva stimolazione sensoriale periferica durante l'esecuzione di compiti manuali appresi può provocare plasticità sensomotoria maladattiva in soggetti sensibili tramite degli effetti facilitatori degli *input* sensoriali sugli *output* motori, rinforzati e meno focali. Restano da chiarire quali meccanismi mediano tale anormale plasticità sensomotoria. Un recente lavoro (Kang *et al.*, 2010) sembra dimostrare che i pazienti affetti da crampo dello scrittore siano caratterizzati da una deficitaria regolazione omeostatica della plasticità pratica-dipendente: in soggetti sani era osservabile una soppressione omeostatica della plasticità pratica-dipendente in seguito ad un protocollo PAS con ISI=25 ms (inducente incremento dell'eccitabilità corticale) se confrontato con un PAS con ISI=10 ms (inducente decremento dell'eccitabilità corticale) ed un PAS con ISI=100ms (condizione di controllo), mentre nei pazienti con crampo dello scrittore tale soppressione non era presente. Questo fenomeno, inoltre, era positivamente correlato con la gravità clinica della distonia focale.

Anche nel disturbo di Parkinson (PD), caratterizzato non solo da rigidità, tremore e ipocinesia, ma anche da disturbi nell'apprendimento motorio (DeLong, 1990; Smiley-Oyen *et al.*, 2003; Frith *et al.*, 1986; Schinder *et al.*, 1995), possono essere osservate alterazioni dei meccanismi di plasticità. Ueki *et al.* (2006), infatti, hanno dimostrato che, in seguito all'applicazione del protocollo PAS (ISI = 25 ms), in

pazienti con PD in assenza di trattamento non si osservava alcun aumento dell'eccitabilità motoria, al contrario di quanto accadeva nei soggetti di controllo sani nei quali era osservabile un netto aumento dell'ampiezza dei MEP in APB. Di particolare interesse, inoltre, è l'osservazione che, in seguito alla somministrazione di dopamina, in questi pazienti, ricomparivano quei fenomeni *LTP-like* solitamente osservati in seguito al PAS. Questi risultati, oltre a confermare la presenza di un'alterata plasticità nei pazienti con PD, indicano che la dopamina sembra giocare un ruolo essenziale nell'indurre cambiamenti plastici in M1. Infatti, nei modelli animali, la dopamina regola direttamente l'induzione di LTP/LTD delle sinapsi glutammatergiche nello striato e nella corteccia prefrontale (Centonze *et al.*, 2001; Otani *et al.*, 2003). E' necessaria l'attivazione dei recettori NMDA situati nello striato per indurre cambiamenti plastici nelle sinapsi corticostriatali (Kita, 1996; Cherubini *et al.*, 1988; Herrling, 1985). A livello molecolare, l'interazione tra dopamina e recettori NMDA controlla la plasticità striatale (Picconi *et al.*, 2004). E' possibile, dunque, che la dopamina controlli la plasticità corticale in M1 tramite i recettori NMDA. Esistono due vie dopaminergiche attraverso le quali potrebbe avvenire in controllo della plasticità in M1: una via indiretta nigrostriatale attraverso il circuito ganglio-talamocorticale, oppure una via diretta mesocorticolimbica, attraverso l'area tegmentale ventrale. Danni alla via nigrostriatale causano i vari sintomi motori tipici del PD (DeLong, 1990; Smiley-Oyen *et al.*, 2003; Frith *et al.*, 1986; Schinder *et al.*, 1995), mentre danni alla via mesocorticolimbica sono connessi con le disfunzioni emotive e delle funzioni cognitive superiori osservate nel PD (Rinne *et al.*, 2000; Ouchi *et al.*, 1999). Poiché i pazienti dello studio di Ueki *et al.* (2006) non presentavano disfunzioni cognitive, ma solo moderati deficit motori, è probabile che la ridotta plasticità corticale in M1 in pazienti con PD sia dovuta a danni della via dopaminergica nigrostriatale.

E' stato generalmente accettato che la plasticità indotta dal PAS sia di origine corticale, poiché, come abbiamo visto, in seguito al PAS è possibile osservare un aumento dei MEP in assenza di modificazioni dell'onda F spinale (Stefan *et al.*, 2000). Basandosi sul fatto che il riflesso H è più adatto dell'onda F nell'identificare modificazioni dell'eccitabilità spinale (Eccles 1955), Meunier *et al.* (2007) hanno investigato l'ipotesi che il PAS possa condurre anche cambiamenti nell'eccitabilità spinale registrando l'onda M e il riflesso H del flessore del polso (FCR) prima e 20-40 minuti dopo l'applicazione del protocollo PAS. Gli autori hanno osservato che tale procedura induce un cambiamento nel riflesso H 20-40 minuti dopo la fine della sua applicazione, riflettendo una modificazione duratura dell'eccitabilità spinale. Non è stato possibile, invece, identificare gli esatti siti spinali dai quali si sviluppano i cambiamenti indotti dal PAS. Lo sviluppo della plasticità spinale sembra dipendere da quello della plasticità corticale, poiché è possibile osservare un aumento dei MEP senza modificazioni del riflesso H, ma mai il contrario. Inoltre, anche se il riflesso H e i MEP hanno dimensioni simili, ciò non significa che essi riflettano l'attivazione della stessa popolazione di motoneuroni (Morita *et al.*, 1999).

I lavori fin qui esaminati prendono in considerazione gli effetti sulla plasticità corticale di procedure sperimentali relative agli arti superiori. Gli studi che prendono in considerazione gli effetti del protocollo PAS sulla rappresentazione motoria corticale degli arti inferiori sono limitati (Uy *et al.*, 2003). Stinear e Hornby (2005) hanno testato l'ipotesi che l'applicazione del PAS alle vie tibiali anteriori (TA) durante l'atto del camminare possa condurre cambiamenti bidirezionali nell'eccitabilità della corteccia motoria. Gli autori hanno dimostrato che tale procedura induce effettivamente delle modificazioni nell'eccitabilità corticale. Tali modificazioni erano caratterizzate da 3 delle proprietà tipiche dei fenomeni usualmente indotti dal PAS: esse, infatti, seguivano la regola temporale, avevano una

rapida evoluzione ed i loro effetti erano persistenti. Inoltre, grazie a delle condizioni di controllo, è stato possibile osservare che nessuna delle componenti utilizzate nella procedura sperimentale aveva effetti sull'eccitabilità corticale se applicata separatamente dalle altre: il semplice atto di camminare, la sola stimolazione elettrica del nervo peroneale durante l'atto di camminare o la sola TMS durante l'atto di camminare non avevano effetti significativi sull'ampiezza dei MEP. La coerenza tra i risultati di questo studio e quelli relativi agli arti superiori precedentemente riportati fa ipotizzare che gli stessi meccanismi neurali siano coinvolti nelle modificazioni indotte dal PAS nella rappresentazione motoria corticale degli arti inferiori e superiori.

1.3 Modificazioni plastiche nella corteccia somatosensoriale

La comprensione delle regole alla base della rappresentazione sensoriale umana è un argomento di notevole interesse fisiologico e clinico. Nella corteccia somatosensoriale animale sono stati documentati LTP ed LTD usando diversi protocolli sia *in vitro* (Aroniadou-Anderjaska e Keller, 1995; Castro-Alamancos *et al.*, 1995; Castro-Alamancos e Connors, 1996; Kitagawa *et al.*, 1997; Feldman, 2000; Heusler *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2002) che *in vivo* (Keller *et al.*, 1990; Glazewski *et al.*, 1998; Froc *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2003; Werk & Chapman, 2003). Tramite tali protocolli è stato possibile osservare il meccanismo noto come “plasticità sinaptica dipendente dal tempo” (*spike-timing-dependent plasticity* – STDP; Song *et al.*, 2000): come discusso per la corteccia motoria (cfr., par 1.2), infatti, anche in questo caso la direzione dei cambiamenti nell'efficacia sinaptica è determinata dalla sequenza dell'attività neuronale pre- e postsinaptica (Dan e Poo; 2004).

Negli esseri umani la plasticità delle rappresentazioni sensoriali è stata studiata tramite l'analisi dei potenziali evocati somatosensoriali (SEP) (Elbert *et al.*, 1995; Flor *et al.*, 1995, 1997; Knecht *et al.*, 1996; Tinazzi *et al.*, 1997b, 1998, 2004; Bara-Jimenez *et al.*, 1998; Elbert *et al.*, 1998). Differenti componenti dei SEP riflettono differenti stadi del processamento dell'informazione somatosensoriale (Tinazzi *et al.*, 1998). L'analisi dei SEP, quindi, rende possibile la localizzazione del sito di cambiamento plastico (Tinazzi *et al.*, 1998). I SEP sono stati anche usati per valutare i cambiamenti nell'eccitabilità corticale indotti sperimentalmente tramite varie manipolazioni esterne come stimolazione elettrica diretta (Matsunaga *et al.*, 2004), TMS ripetitiva (Enomoto *et al.*, 2001; Tsuji e Rothwell, 2002; Ragert *et al.*, 2004) o stimolazione tattile periferica ripetitiva (Pleger *et al.*, 2001). L'uso di tali protocolli, però, non permette di testare la presenza del meccanismo STDP nella corteccia somatosensoriale primaria umana (S1). Per tale motivo, anche per lo studio della plasticità delle rappresentazioni sensoriali è stato introdotto il protocollo PAS, il quale permette il controllo della temporizzazione degli eventi neuronali indotti dai due tipi di stimolazione.

Wolters *et al.* (2005) hanno usato il PAS con TMS sulla corteccia somatosensoriale per testare l'ipotesi che una regola temporale governi l'induzione di cambiamenti plastici bidirezionali nell'area S1 umana, e per valutare la natura e le caratteristiche di tali cambiamenti. In tal modo, gli autori hanno dimostrato che la stimolazione periferica delle vie afferenti somatosensoriali, se accoppiata con TMS a bassa frequenza ad un appropriato intervallo, può indurre cambiamenti nei SEP. In seguito al PAS, l'ampiezza della componente P14 dei SEP, generalmente considerata di origine subcorticale (Desmedt e Cheron, 1981; Moller *et al.*, 1986; Sonoo *et al.*, 1997, Lee e Seyal, 1998), rimane invariata. A livello corticale sono stati osservati, in seguito al PAS, dei cambiamenti nella componente P25, mentre l'ampiezza della

N20 rimaneva costante. Sia la N20 che la P25 sembrano essere generate dal limite posteriore del solco centrale, corrispondente all'area 3b di Brodmann (Allison *et al.*, 1989, 1991; McLaughlin e Kelly, 1993; Urbano *et al.*, 1997; Lee e Seyal, 1998; Mauguiere *et al.*, 1999; Legatt e Kader, 2000; Balzamo *et al.*, 2004). I cambiamenti nella componente P25, quindi, indicano probabilmente dei cambiamenti nell'eccitabilità in S1, sebbene sia possibile che un minore contributo alla componente P25 sorga dal limite anteriore del solco centrale nell'area 4 di Brodmann (Huang *et al.* 2000; Balzamo *et al.*, 2004). Considerando questi dati alla luce di precedenti studi animali (Armstrong-Jones *et al.*, 1992; Ahissar *et al.*, 2001) si potrebbe ipotizzare che i cambiamenti nell'eccitabilità corticale indotti dal PAS siano dovuti alla modulazione dell'attività neuronale eccitatoria degli strati corticali superiori di S1. Alternativamente, tali cambiamenti potrebbero essere dovuti ad alterazioni nell'inibizione delle cellule piramidali corticali. Poiché parte di questa inibizione è sotto il controllo del talamo, è importante considerare la possibilità che i cambiamenti indotti dal PAS possano essere generati a livello subcorticale. I cambiamenti indotti nella componente P25 evolvevano rapidamente, persistevano per un consistente periodo di tempo (almeno 30 minuti) ed erano reversibili. La specificità topografica di tali cambiamenti era suggerita dal fatto che, mentre i SEP del nervo mediano erano alterati, non si osservavano modificazioni del SEP tibiali. La plasticità indotta dal PAS è risultata essere tempo-dipendente: gli effetti della procedura, infatti, erano osservabili solo per un determinato ISI, mentre, se questo veniva modificato, si osservava un cambiamento dell'ampiezza della P25 nella direzione opposta. In seguito ad un singolo impulso magnetico (TMS) su M1, la corteccia emette un treno di potenziali d'azione discendenti (onde D ed onde I) che possono durare più di 10 ms (Di Lazzaro *et al.*, 2004). Mentre le componenti precoci di questo treno sembrano essere generate negli strati corticali inferiori, le onde I

tardive probabilmente riflettono l'attività generata negli strati corticali motori superiori attraverso una catena di interneuroni (Amassian *et al.*, 1987; Ziemann e Rothwell, 2000). Wolters *et al.* (2005) propongono che la TMS possa indurre un'attività polisinfaptica tardiva negli strati superiori in S1 attraverso un meccanismo simile a quello appena descritto per M1 e che siano questi eventi tardivi che interagiscono con i segnali afferenti negli strati corticali superiori in S1.

Murakami *et al.* (2008) hanno valutato la possibilità che la stimolazione tramite PAS della corteccia motoria possa provocare delle modificazioni nella corteccia somatosensoriale. Essi hanno ipotizzato che i fenomeni LTP/LTD-like ottenuti tramite il PAS sulla corteccia motoria si verificano non solo nella corteccia motoria ma anche nella corteccia somatosensoriale ipsilaterale, poiché esistono tra esse dense connessioni cortico-corticali (Enomoto *et al.*, 2001). Gli autori, inoltre, hanno investigato come oscillazioni ad alta frequenza (HFO)¹ possano essere influenzate da fenomeni LTP/LTD-like in seguito al PAS, per comprendere le loro origini anatomiche e fisiologiche. Dai risultati emerge che il PAS sulla corteccia motoria provoca dei cambiamenti nella corteccia somatosensoriale. Le componenti corticali dei SEP incrementavano significativamente dopo PAS con ISI=25 ms, mentre si aveva un effetto opposto con un ISI=10 ms. Non si osservavano effetti sui SEP in seguito al PAS direttamente sulla corteccia somatosensoriale. Per gli autori sono due le possibili ragioni per questa discrepanza: la prima riguarderebbe l'ISI utilizzato nello studio, mentre la seconda prenderebbe in considerazione la possibile esistenza di una differenza nella sensibilità alla TMS tra corteccia motoria e corteccia somatosensoriale. Secondo Ishikawa *et al.* (2007), infatti, esisterebbe una differenza nella soglia per l'induzione dei cambiamenti dovuti alla TMS tra corteccia motoria e

¹ L'attività HFO è caratterizzata da oscillazioni a bassa ampiezza ed alta frequenza (500-800 Hz) sovrapposte all'inclinazione ascendente della risposta primaria N20 in seguito a stimolazione del nervo mediano (Curio *et al.* 1994; Hashimoto *et al.*, 1996)

corteccia somatosensoriale. Murakami *et al.* (2008), quindi, ipotizzano che i fenomeni LTP/LTD-like indotti dal PAS non vengono provocati direttamente nella corteccia somatosensoriale, ma potrebbero diffondersi in quest'ultima tramite le dense connessioni cortico-corticali esistenti tra corteccia motoria e corteccia somatosensoriale. Per quanto riguarda le oscillazioni ad alta frequenza (HFO), queste venivano significativamente aumentate dopo il PAS con ISI=25 ms, mentre decrescevano in modo considerevole con un ISI=10 ms. Non si osservavano effetti sulle HFO in seguito a PAS direttamente sulla corteccia somatosensoriale. Gli autori propongono che i cambiamenti nelle HFO indotti dal PAS riflettano l'attività degli interneuroni inibitori GABAergici allo scopo di regolare i neuroni piramidali nella corteccia somatosensoriale. Poiché, invece, non c'è bisogno di modulare i neuroni piramidali disattivati dopo il PAS con ISI=10 ms sulla corteccia motoria, l'attività HFO può essere ridotta.

Pellicciari *et al.* (2009) hanno cercato di valutare se la plasticità corticale in S1 fosse influenzata dall'invecchiamento. Per fare ciò, gli autori hanno confrontato le variazioni di tipo LTP-like indotte dal protocollo PAS sull'ampiezza delle componenti precoci dei SEP in soggetti giovani ed anziani sani. I risultati mostrano come meccanismi plastici di tipo LTP-like in S1 cambino in funzione dell'età, con un significativo incremento d'ampiezza del complesso N20-P25 negli anziani (9.4%) rispetto ai giovani (5.4%). Il protocollo PAS non provocava significative variazioni delle componenti P14, N30 e P40. In particolare, l'assenza di variazioni della P14, componente generata a livello subcorticale (Desmedt e Cheron, 1980; Lee e Seyal, 1998), è coerente con l'interpretazione secondo cui il principale sito d'azione della plasticità sinaptica indotta dal PAS è a livello corticale, mentre sarebbero esclusi meccanismi di tipo subcorticale (Stefan *et al.*, 2002; Wolters *et al.*, 2003). L'invecchiamento sembra influenzare in modo differente la plasticità delle aree S1

ed M1: come abbiamo visto nel precedente paragrafo, diversi studi hanno osservato una minore capacità di indurre meccanismi LTP-like in corteccia motoria tramite il PAS in soggetti anziani (Fathi *et al.*, 2010; Muller-Dahlhus *et al.*, 2008; Tecchio *et al.*, 2008), mentre lo studio di Pellicciari *et al.* mostra come l'invecchiamento sia connesso con un incremento della plasticità corticale in S1 in soggetti anziani. Sebbene queste aree corticali abbiano simili tipi di neuroni, sono fundamentalmente diverse nei loro circuiti corticali e periferici, nei loro input e output e nelle loro proprietà funzionali e molecolari (Bower e Haberly, 1986; Huntley *et al.*, 1994; Castro-Alamancos e Connors, 1996; Barth, 2002) e sono caratterizzate da diverse capacità plastiche (Donoghue *et al.*, 1990; Castro-Alamancos *et al.*, 1995; Barth, 2002). Inoltre, l'invecchiamento agisce diversamente sulla complessità strutturale e la suscettibilità alla plasticità in queste aree (Dickstein *et al.*, 2007).

Come abbiamo visto nel precedente paragrafo, è stato dimostrato che nei pazienti con distonia focale della mano è osservabile un'anormale plasticità associativa in M1 (Quartarone *et al.*, 2003). Ci si è chiesto se, in questi pazienti, anche la plasticità associativa in S1 sia anomala. E' stato infatti proposto che la distonia possa essere un disturbo sensoriale (Hallett, 1995) e diversi studi mostrano capacità somatosensoriali danneggiate (Tinazzi *et al.*, 1999; Bara-Jimenez *et al.*, 2000a, b; Fiorio *et al.*, 2003; Molloy *et al.*, 2003) e scarsa integrazione sensorimotoria (Murase *et al.*, 2000; Abruzzese *et al.*, 2001; Tamburin *et al.*, 2002) nei pazienti con distonia. E' quindi ipotizzabile che la plasticità corticale in S1 sia disturbata. E' stato suggerito che l'eccessivo movimento nella distonia sia attribuibile ad una perdita di inibizione, dato che il sistema nervoso centrale opera attraverso un bilanciamento tra eccitazione ed inibizione (Hallett, 2004). Alcuni autori hanno inoltre dimostrato che la funzione inibitoria intracorticale in S1 è danneggiata nei pazienti con distonia focale della mano (Tamura *et al.*, 2008).

Tamura *et al.* (2009), quindi, hanno indagato se il PAS su S1 può indurre plasticità corticale in questi pazienti tramite la registrazione dei SEP e confrontando i risultati con soggetti di controllo sani. I risultati di tale studio dimostrano che l'eccitabilità corticale indicata dalle variazioni dei SEP ad impulso singolo veniva aumentata dal PAS nei pazienti distonici più che nei soggetti di controllo. Inoltre, la funzione inibitoria intracorticale veniva influenzata dal PAS. I cambiamenti erano osservabili nella componente P27 ma non nella N20, e tali cambiamenti erano significativi solo nei pazienti con distonia. Le alterazioni della componente P27 riflettono probabilmente cambiamenti funzionali nelle strutture intracorticali in S1. Uno studio su soggetti sani dimostrava che gli effetti del PAS su S1 si presentavano come un incremento dell'attività tangenziale mentre la componente radiale rimaneva stabile, suggerendo che le strutture modificate dal PAS fossero collocate negli strati corticali superiori dell'area 3b di Brodmann (Litvak *et al.*, 2007). L'incrementata plasticità in S1 nei pazienti con distonia focale della mano, perciò, dovrebbe essere attribuita ad una disorganizzazione degli interneuroni negli strati corticali superiori nell'area 3b. Questi risultati, dunque, portano a concludere che, nei pazienti con distonia focale della mano, è osservabile, affianco ad un'alterata plasticità in M1, anche un'anormale plasticità in S1. Ciò, chiaramente, supporta l'ipotesi che la distonia sia un disturbo del sistema sensoriale, oltre che un disturbo motorio.

CAPITOLO SECONDO

LA RELAZIONE TRA PLASTICITA' CORTICALE, SONNO E PRESSIONE VERSO IL SONNO

2.1 L'ipotesi di "Omeostasi sinaptica"

La caratteristica distintiva del sonno NREM è la presenza di un'attività elettroencefalografica ad onde lente, ovvero i neuroni della corteccia cerebrale scaricano e smettono di scaricare insieme in onde caratterizzate da frequenza inferiore ai 4.5 Hz. L'attività ad onde lente è un importante predittore dell'intensità del sonno. E' stato osservato che tale attività ad onde lente aumenta in funzione del periodo di veglia precedente, mentre diminuisce col progredire del periodo di sonno (e.g., Borbely e Achermann, 2000). Questo induce a ritenere che l'attività ad onde lente sia connessa con qualche aspetto ristorativo del sonno. In particolare Tononi e Cirelli (2003, 2006) hanno ipotizzato l'esistenza di una stretta relazione tra sonno e omeostasi sinaptica. Tale ipotesi prevede che:

- 1) la veglia sia associata a potenziamento sinaptico in diversi circuiti cerebrali;
- 2) il potenziamento sinaptico sia legato alla regolazione omeostatica dell'attività ad onde lente;
- 3) l'attività ad onde lente sia associata ad un *downscaling* sinaptico;
- 4) il *downscaling* sinaptico sia connesso con gli effetti benefici del sonno sul funzionamento neurale e, indirettamente, sulla *performance*.

L'ipotesi di "Omeostasi sinaptica" è strettamente connessa con il modello della regolazione del sonno a doppio processo (Borbely e Achermann, 1999). Questo

modello distingue tra due processi di regolazione della propensione al sonno: il processo C, ovvero la componente circadiana, descrive i cambiamenti della propensione al sonno durante le 24 ore, mentre il processo S, ovvero la componente omeostatica, si accumula esponenzialmente durante la veglia e viene scaricata durante il sonno. Per Tononi e Cirelli (2006), il processo S descrive, dal punto di vista della fenomenologia quantitativa dell'EEG del sonno, il processo di omeostasi sinaptica che avrebbe su base cellulare: in condizioni normali, la forza sinaptica totale incrementa durante la veglia e raggiunge il suo massimo prima di andare a dormire. Al sopraggiungere del sonno, la forza sinaptica totale inizia a diminuire, raggiungendo un livello di *baseline* prima della fine del sonno.

Durante la veglia noi interagiamo con l'ambiente ed acquisiamo informazioni su di esso. L'EEG è attivato ed il *milieu* neuromodulatorio favorisce l'immagazzinamento di informazioni (soprattutto tramite LTP). In questo modo vi è un notevole incremento della forza sinaptica, evento che comporta dei costi a livello di energia e spazio richiesti, saturando progressivamente la nostra capacità di apprendere. Quando andiamo a letto, invece, siamo virtualmente disconnessi dall'ambiente. I cambiamenti nel *milieu* neuromodulatorio provocano la comparsa dell'attività ad onde lente ed assicurano che l'attività sinaptica non sia seguita da un ulteriore potenziamento sinaptico. Dato che, alla fine del periodo di veglia, la forza sinaptica media è elevata, i neuroni, durante il sonno ad onde lente sono altamente sincronizzati. L'EEG nelle prime fasi del sonno è, quindi, caratterizzato da onde lente ed ampie. Secondo l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica", la ripetuta sequenza di depolarizzazione-iperpolarizzazione neuronale causa il *downscaling* sinaptico, che sarebbe alla base di un progressivo decremento della forza sinaptica. Ciò provoca una riduzione dell'ampiezza e della sincronizzazione delle oscillazioni lente nel potenziale di membrana, il che si riflette in una ridotta attività EEG ad onde lente. Il

downscaling si ridurrebbe progressivamente, rendendo tale processo auto-limitante quando la forza sinaptica raggiunge un adeguato livello di *baseline*. In questo modo, il sonno rinforzerebbe l'omeostasi sinaptica, con dei benefici in termini di energia, spazio, apprendimento e memoria. Al risveglio, i circuiti neurali mantengono una traccia delle esperienze precedenti, ma sono nuovamente efficienti ed il ciclo può ricominciare.

Analizziamo ora nel dettaglio i punti principali dell'ipotesi di "Omeostasi sinaptica".

2.1.1 Veglia e potenziamento sinaptico

La prima parte dell'ipotesi sostiene che la veglia sia generalmente accompagnata da cambiamenti *LTP-like* nel cervello, sia che gli animali siano impegnati in paradigmi sperimentali di apprendimento, sia che essi siano spontaneamente attivi (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Ciò implica che i cambiamenti plastici a livello sinaptico possono avvenire in assenza di cambiamenti comportamentali generalmente utilizzati come indice di apprendimento. L'incremento della forza sinaptica determinerebbe, durante la veglia, uno sbilanciamento tra potenziamento e depressione sinaptica.

Evidenze dirette a supporto di questa parte dell'ipotesi derivano da studi anatomici su animali che hanno dimostrato un netto e diffuso incremento della densità sinaptica in seguito ad esposizione dell'animale ad ambienti arricchiti, tali da indurre cambiamenti molecolari *LTP-like* (Klintsova e Greenough, 1999). E' stato osservato anche un incremento locale della densità sinaptica (Knott *et al.*, 2002). Diversi studi, inoltre, mostrano come la veglia spontanea sia regolarmente associata con la diffusa induzione di cambiamenti molecolari usualmente associati con il LTP (Cirelli e Tononi, 2000a; Cirelli *et al.*, 2004). Questo fenomeno è ancora più evidente

se l'animale viene mantenuto sveglio più a lungo tramite delicata manipolazione, oppure se è impegnato nell'esplorazione intensiva del suo ambiente. Durante il sonno, invece, l'espressione dei geni legati al LTP è notevolmente ridotta se non abolita (Cirelli e Tononi, 2000a; Cirelli *et al.*; 2004; Cirelli e Tononi, 2000b).

Da un punto di vista evolutivo, ha senso che il potenziamento dei circuiti neurali avvenga durante la veglia, quando un animale è attivo ed esposto all'ambiente, piuttosto che durante il sonno, quando l'attività neurale è disconnessa dagli eventi esterni (Tononi e Cirelli, 2001). Vi sarebbero due ragioni per cui l'induzione di geni connessi con il LTP sarebbe ristretta alla veglia: la prima ragione è che l'attività sensoriale, motoria e cognitiva che avvengono durante la veglia attiva, sono spesso associate con cambiamenti LTP-like (Sjostrom *et al.*, 2001); la seconda ragione riguarda la condizione stato-dipendente di alcuni sistemi neuromodulatori (Tononi *et al.*, 1995). Il sistema noradrenergico, ad esempio, è molto attivo durante la veglia, mentre non lo è durante il sonno (Aston-Jones e Bloom, 1981). La noradrenalina è molto importante per l'induzione del LTP (Walling e Harley, 2004) e lesioni noradrenergiche danneggiano almeno alcune forme di apprendimento (Robbins e Everitt, 1995).

2.1.2 Potenziamento sinaptico e omeostasi ad onde lente

E' risaputo che l'attività ad onde lente nei mammiferi incrementa in proporzione alla durata della veglia precedente e decresce progressivamente durante il sonno (Borbely, 2001). L'ipotesi dell'omeostasi sinaptica sostiene che la regolazione omeostatica dell'attività ad onde lente è legata all'ammontare del potenziamento sinaptico avvenuto nella veglia precedente. In particolare, più alto è l'ammontare del potenziamento sinaptico nei circuiti corticali durante la veglia,

maggiore sarà l'incremento di attività ad onde lente durante il sonno successivo (Tononi e Cirelli, 2003; 2006).

A supporto di questa ipotesi, è stato dimostrato che l'aumento del periodo di veglia produce un incremento nell'espressione di diversi *markers* specifici del LTP (Cirelli e Tononi, 2000), seguito da un incremento dell'attività ad onde lente durante il sonno successivo. Il livello di induzione dei geni connessi con LTP e dell'ammontare dell'attività ad onde lente durante il sonno, dipendevano non solo dalla durata del periodo di veglia, ma anche dalla sua qualità (Kelly e Deadwyler, 2003; Meerlo *et al.*, 2001).

Una diretta previsione dell'ipotesi è che se la veglia non è accompagnata da cambiamenti LTP-like nella forza sinaptica, l'incremento omeostatico dell'attività ad onde lente durante il sonno dovrebbe essere soppresso. Questa previsione è stata testata esaminando animali con lesioni al sistema noradrenergico, nei quali vi è una notevole riduzione dell'espressione dei geni legati al LTP nella corteccia cerebrale dopo periodi di veglia (Cirelli *et al.*, 1996; Cirelli e Tononi, 2000). Sebbene in questi animali la quantità di sonno rimaneva invariata, si osservava la scomparsa del picco di attività ad onde lente osservabile normalmente nelle ore del mattino dopo la fase di attività notturna. Si potrebbe ipotizzare, perciò, che non è la veglia in sé, ma l'induzione dei geni legati al LTP associata alla veglia ad essere responsabile dell'incremento omeostatico nell'attività ad onde lente.

Un'altra previsione dell'ipotesi è che, nel momento in cui il potenziamento sinaptico è particolarmente forte in specifiche aree cerebrali, l'attività ad onde lente durante il sonno successivo dovrebbe incrementare maggiormente in quelle aree. Huber *et al.* (2004) hanno testato questa ipotesi usando EEG ad alta definizione durante il sonno dopo l'apprendimento di un compito visuomotorio. In tale compito, eseguito poco prima di andare a letto, i soggetti agganciavano *target* visivi usando un

cursore guidato manualmente, mentre si adattavano inconsapevolmente alla rotazione sistematica imposta alla traiettoria del cursore percepita. Una settimana prima o dopo, i soggetti eseguivano un compito di controllo soggettivamente indistinguibile ed identico a livello cinematico, ma nel quale la traiettoria del cursore non era ruotata. L'unica differenza tra i due compiti era quindi l'adattamento alla rotazione che coinvolge l'apprendimento implicito di una rotazione compensatoria, presumibilmente mediata da potenziamento sinaptico in specifiche aree cerebrali, elemento assente nel compito di controllo. Precedenti studi che si avvalevano dell'ausilio della PET, infatti, hanno mostrato che l'apprendimento della rotazione coinvolge la corteccia parietale destra. Come previsto dall'ipotesi, in seguito al compito di rotazione, se confrontato con il compito di controllo, era osservabile un incremento locale dell'attività ad onde lente proprio nella corteccia parietale destra. L'incremento delle onde lente declinava col passare del tempo. L'induzione di cambiamenti plastici locali in seguito a compiti visuomotori, quindi, sembrerebbe essere associato all'induzione locale di attività ad onde lente nel sonno successivo (Huber *et al.*, 2004). Questi risultati sono in accordo con evidenze precedenti di omeostasi locale dell'attività ad onde lente in esseri umani (Kattler *et al.*, 1994) e ratti (Vyazovskiy *et al.*, 2000).

Ulteriori evidenze per una relazione tra densità o forza sinaptica ed attività ad onde lente derivano da studi evolutivi. L'attività ad onde lente, nel corso della vita, subisce dei cambiamenti che sembrano seguire la densità sinaptica corticale (Feinberg, 1989; Feinberg *et al.*, 1990; Huttenlocher e Dabholkar, 1997; Sowell *et al.*, 2001). Sia la densità sinaptica che l'attività ad onde lente raggiungono un picco in adolescenza, dopo la quale declinano rapidamente, e continuano a decrescere lentamente nella vecchiaia. Un decremento patologico della densità sinaptica, come

osservato in alcuni disturbi neurodegenerativi e nella schizofrenia, sono associati ad una riduzione dell'attività ad onde lente (Petit *et al.*, 2004; Feinberg, 1982).

Alla base dell'attività EEG ad onde lente abbiamo oscillazioni nei potenziali di membrana neuronali, ed in particolare le oscillazioni lente generate da cellule corticali e sincronizzate dalle connessioni cortico-corticali (Steriade, 2003). Tali oscillazioni sono composte da una fase di depolarizzazione, durante la quale i neuroni sono attivi, ed una di iperpolarizzazione durante la quale i neuroni sono silenti. Quest'ultima fase è probabilmente dovuta ad una corrente di potassio sodio-dipendente attivata dalla scarica neuronale. Le connessioni cortico-corticali più forti provocano una maggiore attivazione della corrente di potassio sodio-dipendente, la quale porta da una fase di iperpolarizzazione più lunga; conseguentemente, le oscillazioni lente hanno una maggiore ampiezza. Inoltre, le connessioni cortico-corticali più forti aumentano il grado di sincronizzazione tra le popolazioni di neuroni (Hill e Tononi, 2005).

2.1.3 Omeostasi ad onde lente e downscaling sinaptico

Secondo l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica" l'attività ad onde lente avrebbe il compito di promuovere un generalizzato *downscaling* della forza sinaptica, ovvero una riduzione proporzionale della forza di tutte le sinapsi convergenti sullo stesso neurone (Tononi e Cirelli, 2003; 2006).

Il *downscaling* (così come l'*upscaling*) delle sinapsi corticali ed ippocampali è stato osservato sia in studi *in vitro* che *in vivo* (Turrigiano, 1999; Desai *et al.*, 2002), nei quali elevando artificialmente l'input sinaptico ad un neurone per alcuni secondi era possibile ottenere una riduzione proporzionale della forza di tutte le sinapsi convergenti sul tale neurone, mentre un blocco prolungato dell'attività neurale produceva l'effetto opposto.

Questo *downscaling* sonno-dipendente coinvolgerebbe molte o tutte le sinapsi di un neurone (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Tale meccanismo si differenzia in questo modo dalla LTD, che colpisce gruppi specifici di sinapsi, e dal depotenziamento, che riguarda solo sinapsi recentemente potenziate (Kemp e Bashir, 2001). Nonostante ciò, è probabile che nel *downscaling* siano coinvolti molti dei meccanismi molecolari coinvolti in LTD e depotenziamento, ed in particolare la defosforilazione e successiva internalizzazione dei recettori AMPA che conduce ad una riduzione dell'efficacia sinaptica (Malinow e Malenka, 2002; Turrigiano, 2000).

L'esponenziale decremento dell'attività ad onde lente durante in sonno (Borbely e Achermann, 1999) rappresenta una forte (indiretta) evidenza elettrofisiologica del *downscaling* durante il sonno. Se l'attività ad onde lente viene soppressa per mezzo di stimoli acustici durante la prima parte del sonno, essa incrementa notevolmente nella seconda parte del sonno (Dijk *et al.*, 1987). E' stato osservato, inoltre, che quando dei neuroni vengono attivati insieme durante la veglia, essi mostrano delle scariche correlate durante il sonno, presumibilmente riflettenti forti connessioni sinaptiche tra loro. La forza di tali correlazioni, e probabilmente la forza delle sinapsi sottostanti, decade rapidamente (entro 30 minuti) durante l'episodio di sonno (Kudrimoti *et al.*, 1999), in linea con il *downscaling*. In accordo con l'ipotesi del *downscaling* sinaptico durante il sonno, vi sono anche degli studi di *neuroimaging* che mostrano un decremento del livello assoluto del metabolismo cerebrale dopo il sonno (Braun *et al.*, 1997).

Durante il sonno, mentre l'espressione delle molecole legate al LTP raggiunge livelli bassi (Cirelli e Tononi, 2000), vi è una maggiore espressione delle molecole implicate in depotenziamento/depressione (Cirelli *et al.*, 2004). Inoltre, il sonno NREM è associato ad alti livelli di insulina (Simon *et al.*, 1994), che promuove l'internalizzazione dei recettori AMPA e la LTD (Man *et al.*, 2000). A

livello metabolico, quindi, il sonno non è solo una condizione sfavorevole per il potenziamento sinaptico, ma è specificamente una condizione favorevole per il *downscaling*.

Alcuni studi hanno portato delle evidenze anatomiche per il *downscaling* durante il sonno, mostrando che l'incremento della densità sinaptica in seguito all'apprendimento è evidente solo per poche ore, dopo le quali la densità sinaptica ritorna a livelli di *baseline* (Eyre *et al.*, 2003). Non è chiaro, però, se il ritorno alla densità sinaptica di *baseline* richiede necessariamente l'intervento del sonno o semplicemente del trascorrere del tempo.

Evidenze funzionali della relazione tra sonno NREM e *downscaling* sinaptico derivano da studi di deprivazione visiva monoculare nei gatti. E' stato osservato che, durante un periodo critico dello sviluppo cerebrale, l'occlusione di un occhio quando l'animale è sveglio nelle ore di luce per 6 ore riduce notevolmente la capacità delle cellule corticali di rispondere all'occhio occluso. Ciò è dovuto alla depressione delle connessioni corticali relative all'occhio deprivato (Heynen *et al.*, 2003). Tale depressione può essere incrementata se l'animale rimane sveglio per ulteriori 6 ore in condizione di luce, ma non al buio. Inoltre, un equivalente incremento della depressione può essere ottenuto se all'animale viene consentito di dormire per 6 ore al buio (Frank *et al.*, 2001). Questo risultato può essere interpretato o come consolidamento sonno-mediato, oppure in termini di *downscaling* sonno-dipendente.

Per spiegare la possibile relazione tra attività ad onde lente e *downscaling* sinaptico è bene ricordare che alla base del sonno NREM vi è l'oscillazione lenta, la quale è caratterizzata da una frequenza inferiore ad 1 Hz, ovvero la frequenza ideale per indurre depressione/depotenzamento nei paradigmi di stimolazione (Kemp e Bashir, 2001). Oscillazioni a bassa frequenza durante il sonno possono promuovere la depressione attraverso cambiamenti nelle dinamiche del calcio (Kemp e Bashir,

2001). Inoltre, può essere importante per favorire il *downscaling* anche il particolare milieu neuromodulatorio del sonno NREM (bassi livelli di acetilcolina, noradrenalina, serotonina ed istamina), così come il fatto che il BDNF è basso durante il sonno (Sheng e Hyoung Lee, 2003). Il fattore più significativo nella promozione del *downscaling* sinaptico, però, sembrerebbe essere la sequenza di depolarizzazione e iperpolarizzazione che caratterizza le oscillazioni lente a livello cellulare (Steriade, 2003).

2.1.4 Downscaling sinaptico e performance

L'ultima parte dell'ipotesi sostiene che il *downscaling* sinaptico sonno-dipendente sia benefico per le funzioni cellulari e legato a miglioramenti delle *performance* (Tononi e Cirelli, 2003). Molti aspetti delle *performance* comportamentali migliorano dopo il sonno, mentre la deprivazione di sonno ha su di esse un impatto negativo. E' plausibile che evitare un sovraccarico sinaptico mantenendo l'omeostasi sinaptica sia benefico per molte attività cellulari (Tononi e Cirelli, 2003).

Alcuni studi hanno dimostrato che il sonno successivo all'apprendimento di una sequenza di colpi delle dita provoca un sostanziale miglioramento della *performance*, e che tale miglioramento sia strettamente legato al sonno e non al ritmo circadiano o al semplice passare del tempo (Walker *et al.*, 2002). Secondo l'ipotesi dell'omeostasi sinaptica, per spiegare questi risultati bisogna considerare che, durante un qualsiasi compito visuomotorio, mentre le sinapsi che contribuiscono ai movimenti corretti diventano progressivamente più efficaci (segnale), altre sinapsi, che contribuiscono ai movimenti erronei o imperfetti, possono essere potenziate (rumore). E' qui che entrerebbe in gioco il *downscaling* sinaptico, incrementando il rapporto segnale/rumore (Tononi e Cirelli, 2003). Secondo l'ipotesi, infatti, durante

il sonno la forza di ogni sinapsi decresce proporzionalmente, mentre il peso totale delle sinapsi convergenti su un singolo neurone ritorna ad un livello di *baseline*. Poiché vi è una soglia sotto la quale le sinapsi diventano inefficaci o silenti, le sinapsi che contribuiscono al rumore, essendo mediamente più deboli di quelle che contribuiscono al segnale, cesserebbero di interferire con la *performance* (Tononi e Cirelli, 2003). Il *downscaling* sinaptico, quindi, neutralizzerebbe il potenziamento sinaptico incontrollato, e promuoverebbe la competizione, particolarmente importante durante lo sviluppo.

Secondo l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica", infine, il *downscaling* sinaptico durante il sonno sarebbe essenziale anche per un sostanziale recupero di energia. Il *downscaling*, infatti, sarebbe necessario per interrompere la crescita della forza sinaptica associata alla veglia (che ha un notevole costo in termini di energia) e per prevenire un sovraccarico delle sinapsi (Tononi e Cirelli, 2006). Inoltre, si pensa che il potenziamento sinaptico sia accompagnato da cambiamenti morfologici, come l'aumento delle dimensioni di bottoni e spine e l'incremento del numero delle sinapsi (Klintsova, 1999; Knott *et al.*, 2002; Eyre *et al.*, 2003). Poiché minuscoli incrementi nel volume cerebrale potrebbero essere estremamente pericolosi (Chklovskii, 2002), il *downscaling* sonno-dipendente sarebbe fondamentale, quindi, per tenere sotto controllo la crescita del volume cerebrale (Tononi e Cirelli, 2006).

2.2 Conferme dai modelli animali

Molti studi hanno cercato di dare conferma all'ipotesi di Omeostasi Sinaptica per mezzo di modelli animali. In particolare, il gruppo di Vyazovskiy che lavora nel laboratorio di Chiara Cirelli a Madison, in una serie di esperimenti, ha cercato di indagare le diverse predizioni di tale ipotesi. Innanzitutto, basandosi sull'osservazione che la veglia prolungata porta a differenze regionali

nell'incremento della *slow wave activity* (SWA) durante il sonno successivo nell'umano (Achermann *et al.*, 2001; Finelli *et al.*, 2001), nel ratto (Schwierin *et al.*, 1999; Vyazovskiy *et al.*, 2002), nel topo (Huber *et al.*, 2000) e nel criceto (Palchykova *et al.*, 2002), gli autori hanno cercato di valutare se tali differenze regionali nella SWA in seguito a deprivazione di sonno fossero la conseguenza di differenze nel metabolismo cerebrale e se il sonno contribuisse al recupero dei cambiamenti metabolici avvenuti nel corso della veglia precedente (Vyazovskiy *et al.*, 2004). I risultati mostravano come 6 ore di deprivazione di sonno combinate con stimolazione unilaterale delle vibrisse in un ambiente arricchito provocavano un'asimmetria interemisferica nel recupero di 2-deossiglucosio (2-DG) nella corteccia primaria somatosensoriale, con valori maggiori nell'emisfero controlaterale alla stimolazione. Tale differenza sembrava essere una diretta conseguenza della stimolazione, dato che non è stata osservata nè dopo due ore ulteriori di veglia prolungata senza stimolazione, nè dopo circa due ore di sonno di recupero. Oltre alla corteccia somatosensoriale, altre regioni che andavano incontro ad un marcato aumento della risposta metabolica erano le aree frontali (corteccia motoria primaria) e la corteccia retrospleniale. Inoltre, nel periodo di sonno successivo alla deprivazione, era possibile osservare un generale incremento della SWA nel sonno NREM, con delle differenze sia a livello interemisferico (asimmetria interemisferica in corrispondenza della corteccia parietale nel corso delle prime 10 ore di sonno) sia sull'asse antero-posteriore (iniziale predominanza frontale della SWA, seguita da una predominanza parietale nella parte finale del periodo di sonno). In sintesi, le regioni che mostravano un incremento stimolazione-dipendente della captazione di 2-DG dopo deprivazione di sonno corrispondevano funzionalmente alle regioni che mostravano, durante il sonno successivo, un maggior incremento della SWA. Gli autori concludono che tale risultato supporta l'ipotesi secondo cui la regolazione del

sonno ha una componente locale ed uso-dipendente. Le differenze EEG osservate durante il sonno di recupero potrebbero essere una conseguenza dell'incremento selettivo dell'attivazione metabolica durante la veglia precedente. Nonostante ciò, il recupero dallo squilibrio nel metabolismo cerebrale era osservabile anche in assenza di sonno e non rifletteva direttamente cambiamenti nella SWA durante il sonno. Successivamente gli autori hanno utilizzato i dati raccolti in questo studio per valutare se il tasso metabolico cerebrale, quantificato in termini di valore assoluto di captazione di 2-DG, sia più alto dopo un periodo di veglia e più basso dopo un periodo di sonno. Tale quesito nasce dall'ipotesi secondo cui la veglia sarebbe associata ad un netto incremento del peso sinaptico, mentre il sonno sarebbe associato al *downscaling* sinaptico (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). I risultati (Vyazovskiy *et al.*, 2008) dimostrano come, effettivamente, il valore assoluto di captazione di 2-DG fosse maggiore in topi che avevano trascorso un lungo periodo di veglia prima del sacrificio, rispetto a topi a cui era concesso di dormire *ad libitum*. Tale risultato indica come la precedente storia di sonno-veglia sia un fattore determinante per il tasso metabolico cerebrale. L'effetto della precedente storia di sonno-veglia sulla captazione del 2-DG era osservabile non solo a livello corticale ma anche nella sostanza bianca (corpo calloso), coerentemente con i dati di un precedente studio che mostrava come, nelle scimmie, l'assorbimento del 2-DG durante il sonno diminuiva rispetto alla veglia del 16-46% in diverse aree corticali e del 20% nel corpo calloso (Kennedy *et al.*, 1982). Questo dato suggerisce che il bisogno di energia dopo il sonno è ridotto sia in regioni ricche di connessioni sinaptiche come la corteccia cerebrale, sia in regioni, come il corpo calloso, cruciali per il "dialogo" neuronale e costituite prevalentemente da assoni. Gli autori, infine hanno osservato che le aree cerebrali dove l'assorbimento del 2-DG incrementava maggiormente all'aumentare del periodo di veglia mostravano un minor decremento

dopo il sonno. Al contrario, quelle aree in cui i valori del 2-DG aumentavano di poco mostravano, dopo il sonno, un decremento più pronunciato. Tale risultato è apparentemente sorprendente, dato che gli autori si aspettavano un maggior incremento del bisogno di sonno (e quindi un maggiore declino nel metabolismo del glucosio durante il sonno) in quelle aree che durante la veglia mostravano un maggior incremento di utilizzo del glucosio. Una possibile spiegazione per questo fenomeno è che le regioni che mostravano solo un piccolo incremento nella captazione del 2-DG avessero un tasso metabolico vicino alla saturazione, e che necessitava, quindi, di un maggior decremento durante il sonno. Questa interpretazione è in accordo con l'ipotesi di omeostasi sinaptica, poiché se alti tassi metabolici sono il risultato di un alto peso sinaptico, il *downscaling* durante il sonno dovrebbe essere più efficiente: Inoltre, questi dati sono coerenti con l'aumento esponenziale del processo omeostatico S, un *marker* della pressione del sonno (Borbely, 1982), e con le differenze regionali nell'intensità del sonno (Vyazovskiy *et al.*, 2004).

In uno altro studio, Vyazovskiy *et al.* (2006) hanno osservato che, se a topi abituati a correre su una ruota per roditori veniva bloccata la ruota impedendo loro di correre, durante il sonno successivo si osservava una significativa modificazione delle frequenze EEG rispetto al giorno precedente, in termini di incremento dell'attività lenta delta e theta nelle derivazioni frontali, mentre nelle derivazioni parietali era osservabile un decremento di tali frequenze. Quando ai topi era permesso di correre sulla ruota, invece, si osservava, durante il sonno successivo, un marcato incremento dell'attività theta, mentre l'attività delta (sia a livello frontale che parietale) era soppressa. Tale risultato supporta l'ipotesi che meccanismi locali e attività-dipendenti contribuiscano a generare le differenze regionali dell'incremento omeostatico dell'intensità del sonno successivo ad un periodo di veglia. In accordo

con tale ipotesi, Hanlon *et al.* (2009) hanno dimostrato che, in ratti sottoposti all'apprendimento di un compito motorio era possibile osservare, durante il sonno successivo all'addestramento, un incremento della SWA nella corteccia motoria controlaterale all'arto usato per apprendere il compito, mentre in altre aree corticali non si osservava nessun incremento (o un incremento minimo) della SWA. L'incremento osservato era reversibile entro un'ora, specifico per il sonno NREM e positivamente correlato con cambiamenti nella prestazione durante la precedente sessione di apprendimento, suggerendo che tale incremento dell'attività ad onde lente rifletta meccanismi plastici e non la mera attività motoria. Inoltre, i livelli di Fos e Arc (due geni attività-dipendenti coinvolti nell'apprendimento motorio) erano più alti nella corteccia motoria controlaterale all'arto usato per l'apprendimento piuttosto che in quella ipsilaterale, anche se tale asimmetria non era più osservabile dopo un'ora di sonno.

Vyazovskiy *et al.* (2008) hanno dimostrato, inoltre, come tipici correlati molecolari (maggiore attività post-sinaptica dei recettori glutammatergici AMPAR) ed elettrofisiologici (aumento dell'inclinazione delle risposte *local field power* mediate da stimolazioni elettriche) del LTP sono maggiori durante la veglia piuttosto che nel sonno, e dipendono dalla storia di sonno-veglia dell'animale, piuttosto che da fattori circadiani o dalle condizioni di luce-buio.

In un recentissimo lavoro, infine, in gruppo di Vyazovskiy (2012) ha dimostrato come in seguito a deprivazione di sonno, nei ratti, molti neuroni corticali rispondano ad una microstimolazione elettrica locale in modo più rapido, forte e sincronizzato rispetto ad una condizione di controllo, supportando l'ipotesi che l'eccitabilità corticale incrementi in seguito a perdita di sonno e/o la connettività intracorticale sia maggiore (Huber *et al.*, 2012; Vyazovskiy *et al.*, 2008). Tali neuroni, inoltre, sarebbero anche maggiormente bistabili e questo, per gli autori,

sarebbe una delle principali cause dei deficit cognitivi e comportamentali osservabili in seguito a deprivazione di sonno.

Evidenze a favore di una relazione tra sonno e plasticità corticale deriverebbero anche da una serie di recenti studi sulla *Drosophila melanogaster*. Gilestro *et al.* (2009) hanno osservato che la deprivazione di sonno (ma non il semplice trascorrere del tempo) induceva in tali mosche un incremento dei livelli di diversi tipi di proteine pre- e post-sinaptiche, mentre durante il sonno il livello di tali proteine si riduceva. Nello stesso periodo, Donlea *et al.* (2009) hanno osservato che mosche mutanti, nelle quali erano assenti dei geni necessari per la regolazione dell'orologio circadiano, non erano in grado di dormire a lungo dopo essere state stimolate socialmente durante il giorno (cosa che accade, invece, nelle mosche normali). Se il funzionamento di tali geni veniva ripristinato, era possibile osservare l'incremento della quantità di sonno in seguito all'arricchimento sociale. Gli autori hanno osservato, inoltre, che le stesse esperienze sociali che incrementavano il bisogno di sonno, incrementavano, allo stesso tempo, il numero di sinapsi tra i neuroni ventrali laterali e i loro *partner* nel tronco encefalico. In uno studio successivo è stato dimostrato che l'induzione sperimentale di uno stadio di quiescenza che raggiunge i criteri per l'identificazione del sonno nella *Drosophila* è in grado di facilitare la formazione di memoria a lungo termine in un protocollo di *training* che, di per sè, è in grado di indurre solo processi di memoria a breve termine (Donlea *et al.*, 2011). Infine, Bushey *et al.* (2011) hanno osservato come in diversi circuiti neurali della *Drosophila* il numero e la dimensione delle sinapsi aumenta dopo poche ore di veglia e si riduce solo se agli animali è permesso dormire. Più le esperienze di veglia erano ricche, maggiore era la crescita sinaptica, ed il bisogno di sonno incrementava ulteriormente. Inoltre, gli autori hanno dimostrato come il gene *Fmr I* (*Fragile X mental retardation I*) gioca un ruolo importante nella

rinormalizzazione sinaptica sonno-dipendente. Tali risultati supportano l'ipotesi che processi plastici durante la veglia siano connessi ad un netto incremento della forza sinaptica in molti circuiti cerebrali e che il sonno sia connesso ad un processo di rinormalizzazione sinaptica.

In linea con gli studi sulla *Drosophila*, è stato recentemente dimostrato che l'efficacia sinaptica corticale, valutata in termini di ampiezza e frequenza dei mEPSC (*miniature excitatory postsynaptic currents*) nel cervello di topi e ratti, incrementava dopo periodi di veglia e tornava a bassi livelli dopo un periodo di sonno (Liu *et al.*, 2010).

2.3 L'induzione di effetti di plasticità LTP-like nell'uomo

Alcuni studi hanno cercato di indagare in modo specifico la relazione tra il sonno e l'induzione di fenomeni di plasticità sinaptica nella corteccia cerebrale umana. Come abbiamo visto nel precedente paragrafo, l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica" prevede che l'attività ad onde lente corticale rifletta l'entità del potenziamento sinaptico innescata dalla plasticità esperienza-dipendente durante la veglia (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Per testare questa ipotesi, Huber *et al.* (2007) hanno valutato gli effetti della rTMS a 5 Hz (protocollo di potenziamento) e di una sessione *sham* (stimolazione simulata) sull'attività ad onde lente nel sonno successivo, monitorata con EEG ad alta densità. I risultati mostrano come la rTMS ad alta frequenza sulla corteccia motoria (ma non la stimolazione *sham*) provoca un incremento locale nell'ampiezza delle risposte EEG all'impulso della TMS, seguito, durante il sonno successivo, da un incremento locale dell'attività ad onde lente. L'incremento della risposta elettroencefalografica alla TMS e l'aumento dell'attività ad onde lente erano localizzati entrambi nella stessa regione corticale premotoria ed erano positivamente correlati; i due effetti, quindi, erano specifici a livello spaziale e

topograficamente congruenti. Inoltre, l'incremento dei potenziali evocati dalla TMS durante la veglia prevedeva l'ampiezza dell'incremento dell'attività ad onde lente durante il sonno, in modo consistente con la possibilità che i due effetti siano legati causalmente. Questi risultati, quindi, sembrano supportare l'ipotesi che collega la forza sinaptica con l'attività ad onde lente durante il sonno (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Se tale ipotesi è corretta, è possibile prevedere che la manipolazione connessa con la depressione della forza sinaptica sia associata ad un decremento locale dell'attività ad onde lente. Huber *et al.* (2006) hanno testato questa ipotesi usando un paradigma di immobilizzazione a breve termine di un arto, procedura che nei modelli animali è risultata essere connessa con una depressione sinaptica locale nell'area sensomotoria (Allen *et al.*, 2003; Heynen, 2003). Gli autori hanno indagato l'ipotesi che 12 ore di immobilizzazione di un arto provocassero: un deterioramento della *performance* motoria; una riduzione dei MEP indotti tramite TMS; una depressione dei SEP sulla corteccia sensomotoria, misurati tramite stimolazione elettrica del nervo mediano ed EEG ad alta densità; una riduzione locale dell'attività ad onde lente sull'area sensomotoria stessa durante il sonno successivo. Dai risultati è emerso che, effettivamente, 12 ore di immobilizzazione di un arto sono sufficienti per indurre un marcato e persistente deterioramento nella *performance* motoria, affiancato da una depressione dei MEP e dei SEP. In particolare, era osservabile un decremento nell'ampiezza ed un aumento della latenza della componente P45 dei SEP del nervo mediano. La depressione di tale componente, in assenza di modificazioni delle componenti precoci, indica un *locus* corticale per gli effetti di plasticità. La natura dei cambiamenti riscontrati nei SEP (ridotta ampiezza ed aumentata latenza) suggerisce che i cambiamenti plastici indotti dall'immobilizzazione dell'arto siano probabilmente dovuti a depressione sinaptica. Per quanto riguarda la relazione tra plasticità e sonno, i risultati di questo studio

hanno dimostrato che, in seguito ad immobilizzazione per 12 ore di un arto, era osservabile, durante il sonno successivo, un decremento locale di attività ad onde lente. Tale decremento, inoltre, era correlato con il deterioramento della *performance* motoria. Questi dati, chiaramente, supportano l'ipotesi che la quantità di attività ad onde lente rifletta il livello di forza sinaptica (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Inoltre, la specifica osservazione che una procedura sperimentale connessa con la depressione sinaptica provochi una riduzione dell'attività ad onde lente durante il sonno suggerisce che la diminuzione di tale attività osservata in alcuni disturbi neuropsichiatrici come depressione maggiore, schizofrenia, disturbo di Parkinson, disturbo di Alzheimer (Kryger *et al.*, 2000), così come nel normale invecchiamento (Kryger *et al.*, 2000) può rappresentare un *marker* di una sottostante riduzione dell'efficacia sinaptica (Tononi e Cirelli, 2006).

Anche il paradigma PAS è stato utilizzato per comprendere meglio la relazione tra sonno e plasticità sinaptica. De Gennaro *et al.* (2008) hanno confrontato gli effetti sul tracciato EEG durante il sonno di due tipi di PAS (entrambi con TMS sulla corteccia motoria e stimolazione elettrica del nervo mediano) in soggetti sani: un paradigma *LTP-like* (PAS a 25 ms) che induce potenziamento sinaptico, ed una condizione di controllo (PAS a 50 ms) non connesso con alcun tipo di modificazione plastica. Gli autori ipotizzavano che solo la stimolazione a 25 ms avrebbe indotto un aumento localizzato dell'attività ad onde lente. A questo scopo, le registrazioni EEG sullo scalpo vennero studiate in 4 notti di sonno consecutive: i soggetti si sottoponevano ai due diversi protocolli PAS prima di andare a dormire la terza e la quarta notte, mentre la prima notte era considerata di adattamento e la seconda di *baseline*. I risultati dimostrano che la manipolazione sperimentale dell'eccitabilità della corteccia motoria ottenuta con il PAS a 25 ms era in grado di indurre un aumento dei MEP del 48%. Il PAS a 50 ms, invece, non induceva cambiamenti

significativi. La macrostruttura del sonno non era stata influenzata dalla manipolazione sperimentale, mentre era possibile osservare delle modificazioni all'interno del tracciato EEG sia del sonno NREM che del sonno REM.

Gli autori hanno distinto tra effetti non-specifici e specifici. Per effetti non-specifici si intendono cambiamenti EEG osservati comparando il sonno post-stimolazione con il sonno di *baseline*, senza possibilità di districare gli effetti dovuti al PAS *per sé* da specifici meccanismi *LTP-like*. Diversi aspetti della procedura PAS inducevano cambiamenti nel tracciato EEG sia del sonno NREM che del sonno REM, e questi cambiamenti erano massimi per l'attività ad onde lente dei siti fronto-centrali della linea mediana. E' necessario, quindi, tenere in considerazione l'effetto che questi aspetti procedurali (valutazione della soglia motoria individuale, misurazione dei MEP in risposta all'impulso magnetico al 130% della soglia motoria individuale, stimolazione elettrica del nervo mediano destro, rivalutazione di soglia motoria e MEP) possono avere sulla successiva notte di sonno. Vennero considerati effetti specifici, invece, quelli direttamente correlati con meccanismi *LTP-like* indotti dalla procedura PAS a 25 ms.

Questo è il primo studio che esamina gli effetti dei cambiamenti sinaptici locali durante la veglia sulla successiva intera notte di sonno. Studi precedenti, infatti, investigavano tali effetti solo durante il primo episodio NREM (Huber *et al.*, 2004; 2006; 2007). Come emerge dai risultati, la notte di sonno post-potenziamento era caratterizzata da due cambiamenti principali, prevalentemente condivisi dagli stadi NREM e REM: le aree frontali e prefrontali mostravano un incremento dell'attività ad onde lente, mentre le aree ipsilaterali e controlaterali alla corteccia motoria stimolata mostravano un decremento di tale attività ad onde lente. Lo stesso *pattern* di cambiamento venne confermato anche per la frequenza *theta*. Gli effetti sul sonno REM sembrano abbastanza inaspettati: l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica",

infatti, associa implicitamente i cambiamenti plastici nei circuiti corticali locali durante la veglia ai cambiamenti omeostatici dell'attività ad onde lente durante il sonno NREM (Tononi e Cirelli, 2003). In realtà esistono alcune osservazioni che possono spiegare questi risultati. Innanzitutto, un recente studio ha dimostrato che indicatori elettrofisiologici della forza sinaptica, associati con alta e bassa pressione verso il sonno, cambiano in modo simile in veglia attiva, sonno NREM e sonno REM (Vyazovskiy *et al.*, 2008). Inoltre, sonno REM e NREM condividono alcune regole omeostatiche, come l'incremento nell'attività delle onde lente nella notte di recupero dopo selettiva e parziale deprivazione di sonno (Ferrara *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 1993). La relazione tra i cambiamenti plastici in specifici circuiti corticali durante la veglia e i successivi cambiamenti nel sonno, quindi, potrebbero essere indipendenti dalle differenze neurofisiologiche e neuromodulatorie tra sonno NREM e REM.

In questo studio, l'incremento dell'attività ad onde lente era massimo in regioni diverse da quella stimolata (M1). In particolare, gli effetti maggiori si osservavano sui siti Fp2 ed F8 durante il sonno NREM, e si estendevano ai siti premotori di sinistra. Gli effetti *LTP-like*, quindi, sembrerebbero connessi con siti diversi da quello stimolato, ma altamente connessi con esso. L'incremento dell'attività ad onde lente nelle regioni frontali e prefrontali coesisteva con uno specifico *pattern* di decremento dell'attività ad onde lente nelle aree ipsilaterali e controlaterali alla corteccia motoria stimolata. Probabilmente, la selettiva stabilizzazione delle connessioni neuronali legate all'apprendimento necessita un incremento focale dell'eccitabilità di alcune reti neurali, rinforzando l'eccitabilità e la forza sinaptica delle connessioni neuronali correlate con l'apprendimento, ma inibendo l'eccitabilità di altre. Questi risultati, quindi, sembrano essere in accordo con la nozione che cambiamenti nella forza sinaptica provocano cambiamenti nella regolazione locale del sonno.

Con un protocollo sperimentale assai simile, Bergmann *et al.* (2008) hanno confrontato gli effetti sul sonno successivo di un protocollo PAS (TMS su M1 sinistra e stimolazione elettrica del nervo mediano destro) inducente fenomeni LTP-like, uno inducente fenomeni LTD-like ed uno non connesso con alcun tipo di effetto tempo-dipendente (controllo), tutti somministrati prima di andare a dormire. Gli effetti del PAS venivano valutati tramite la registrazione dei MEP 10 minuti prima e dopo la procedura PAS. Inoltre, vennero registrati i MEP anche il mattino successivo, circa 20 minuti dopo il risveglio del soggetto. Dai risultati emerge che l'induzione di meccanismi LTP/LTD-like durante la veglia era seguita da cambiamenti nell'espressione regionale dell'attività ad onde lente e dei fusi lenti entro la prima ora di sonno NREM. L'espressione locale dei fusi lenti, inoltre, era significativamente correlata con differenze interindividuali nell'efficacia della procedura inducente LTP e la procedura inducente LTD nel potenziare o sopprimere l'eccitabilità corticale. Va però rilevato che, nonostante l'elevata variabilità interindividuale nell'efficacia del PAS, gli effetti medi sui MEP sia della procedura inducente LTP che della procedura inducente LTD persistevano dopo la notte di sonno. Tale risultato è consistente con l'ipotesi che il sonno supporti il consolidamento di nuove informazioni (Stickgold, 2005; Born *et al.*, 2006).

Infine, per testare direttamente l'ipotesi che l'attività ad onde lente aumenti in seguito a manipolazioni che favoriscono il potenziamento sinaptico e diminuisca, invece, in seguito a condizioni che portano alla depressione sinaptica, è importante confrontare gli effetti sull'attività ad onde lente di paradigmi sperimentali inducenti potenziamento e depressione sinaptica quanto più simili possibile. Huber *et al.* (2008), a questo scopo, hanno confrontato gli effetti sul sonno successivo della procedura PAS (TMS sull'area motoria sinistra e stimolazione elettrica sul nervo mediano controlaterale) con ISI=25 ms, inducente fenomeni LTP-like, e della stessa

procedura ma applicata con un ISI=10 ms, connesso con fenomeni LTD-*like*, con una stimolazione *sham*. Entrambe le procedure venivano applicate sugli stessi soggetti. I risultati mostrano che, quando il PAS induceva un aumento nell'ampiezza dei MEP, esso era seguito da un incremento locale dell'attività ad onde lente durante il sonno. Al contrario, quando il PAS produceva una diminuzione dell'ampiezza dei MEP, essa era seguita da un decremento locale dell'attività ad onde lente durante il sonno. Anche in questo studio, inoltre, la locazione spaziale dei cambiamenti nell'eccitabilità corticale corrisponde con quella dei cambiamenti nell'attività ad onde lente. Sembra, quindi, che i cambiamenti plastici provocati dal protocollo PAS e i cambiamenti nell'attività ad onde lente durante il sonno successivo vadano nella stessa direzione. E' necessario notare che in questo studio, come in altri precedenti (Fratello *et al.*, 2006), è stata osservata una grande variabilità interindividuale negli effetti del PAS sui MEP: in alcuni soggetti, la procedura con ISI=25 ms provocava una depressione dei MEP, mentre la procedura con ISI=10 ms induceva un potenziamento. I soggetti, perciò, venivano raggruppati sulla base dei cambiamenti osservati nelle risposte elettroencefalografiche evocate dalla TMS (potenziamento o depressione) piuttosto che sulla base dell'ISI utilizzato.

Anche se sono indubbiamente necessari ulteriori studi per elucidare i meccanismi neuronali che controllano gli effetti della plasticità corticale sul sonno successivo, i risultati qui analizzati sembrano supportare l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica", dimostrando non solo che cambiamenti nell'eccitabilità corticale provocano modificazioni nella successiva attività ad onde lente durante il sonno, ma anche che la direzione dei cambiamenti plastici (potenziamento o depressione) risulta essere coerente con quella dei successivi cambiamenti nel sonno successivo (aumento o diminuzione dell'attività ad onde lente).

2.4 Plasticità, eccitabilità cerebrale e pressione verso il sonno. Una possibile relazione?

La privazione di sonno provoca gravi alterazioni nei livelli di vigilanza e nelle *performance* degli individui. Le conoscenze relative a tali deterioramenti neurocomportamentali sono ben consolidate; il primo contributo in proposito, infatti, risale alla fine dell'Ottocento (De Manacèine, 1894). Più recentemente, la ridotta vigilanza in seguito a privazione di sonno è stata dimostrata tramite misure oggettive e soggettive della sonnolenza (Curcio *et al.*, 2001; Cluydts *et al.*, 2002). La *performance* in semplici compiti di vigilanza, attenzione e tempi di reazione è negativamente influenzata dalla privazione di sonno (Dinges e Cribbs, 1991), così come la *performance* in compiti complessi che coinvolgono il lobo frontale o le funzioni esecutive (Jones e Harrison, 2001).

Gli effetti degradanti della privazione di sonno su vigilanza e *performance* cognitive suggeriscono la presenza di sottostanti cambiamenti fisiologici e nelle funzioni cerebrali. Una notte di privazione di sonno è risultata essere associata: ad un decremento significativo nel metabolismo del flusso globale cerebrale del glucosio (Thomas *et al.*, 2000; 2003), a nessun decremento del metabolismo cerebrale complessivo rilevato attraverso F-18 deossiglucosio (Wu *et al.*, 1991) e ad un aumento dell'attivazione in varie regioni corticali (Drummond *et al.*, 2000; 2005; Mu *et al.*, 2005) e talamiche (Ayalon *et al.*, 2006; Portas *et al.*, 1998), rilevato mediante l'utilizzo della fMRI. Tali risultati contrastanti sono stati attribuiti a variazioni compito-specifiche dell'attività cerebrale, dato che gli studi sopra citati hanno valutato i cambiamenti metabolici cerebrali durante l'esecuzione di compiti diversi tra loro, ma sono necessari ulteriori studi. Le modificazioni rilevate nelle risposte cerebrali, inoltre, potrebbero essere influenzate dalla presenza di un reclutamento compensatorio di risorse, allo scopo di contrastare gli effetti della

deprivazione di sonno sulla *performance* cognitiva; tale fenomeno provocherebbe un'interazione tra gli sforzi prodotti per mantenere lo stato di veglia ed i processi che tendono ad innescare involontariamente il sonno nei soggetti sottoposti a deprivazione. E' stato effettivamente dimostrato che i *lapse* attentivi (p.e., l'assenza di risposte comportamentali a stimoli visivi salienti) successivi alla deprivazione di sonno sono associati ad una minore attivazione, rilevata da fMRI, nelle regioni fronto-parietali, nella corteccia sensoriale e nel talamo rispetto a periodi *nonlapse*. Al contrario, durante periodi *nonlapse* è stata riscontrata un'attivazione neurale normale (Chee *et al.*, 2008). Lo svolgimento di un compito in condizioni di deprivazione di sonno, dunque, prevederebbe dei periodi caratterizzati da un funzionamento neurale apparentemente normale alternati a dei periodi di diminuito funzionamento corticale.

D'altro canto, i pochi studi di *brain imaging* in condizioni di *resting* presenti in letteratura suggeriscono la presenza di una correlazione positiva tra CBF regionale ed ore trascorse in veglia (Braun *et al.*, 1997; Christina *et al.*, 2006).

Un altro approccio per la valutazione oggettiva delle conseguenze neurofisiologiche della deprivazione di sonno è l'analisi quantitativa delle componenti di frequenza dell'EEG. E' stato rilevato che le frequenze EEG superiori a 8 Hz aumentano progressivamente durante 40 ore di veglia sostenuta (Aeschbach *et al.*, 1997; Cajochen *et al.*, 1995). L'analisi topografica dell'andamento della densità di potenza nella banda del *theta* durante veglia prolungata indica che i maggiori incrementi sono localizzati in corrispondenza delle derivazioni corticali centro-frontali (Tinguely *et al.*, 2006; Finelli *et al.*, 2000).

Solo pochi studi hanno valutato gli effetti della deprivazione di sonno sulla corteccia motoria umana e sull'eccitabilità corticospinale tramite la TMS. Secondo l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica", dei periodi prolungati di veglia indotti da deprivazione di sonno, dovrebbero essere associati ad incrementi aggiuntivi della

forza sinaptica. D'altro canto, dovrebbe risultare più difficile produrre variazioni di plasticità cerebrale basate su LTP, oltre uno specifico livello. I meccanismi di induzione di LTP in specifici circuiti neurali, infatti, potrebbero venire "saturati" qualora l'aumento della forza sinaptica raggiunga una soglia limite (Tononi e Cirelli, 2003). Usando la tecnica della TMS ad impulsi appaiati (Kujirai *et al.*, 1993), alcuni lavori che comparavano i valori di *baseline* valutati al mattino con registrazioni eseguite alla stessa ora dopo 24 ore di privazione di sonno non hanno osservato differenze in SICI e SICF (Manganotti *et al.*, 2001; 2006). D'altra parte, Civardi *et al.* (2001) mostrano una riduzione sia della SICI che della SICF dopo privazione di sonno. La piccola dimensione dei campioni e la possibile influenza di fattori circadiani possono rendere conto di questi risultati contrastanti. Altri studi, infatti, sembrano andare nella direzione di un incremento dell'eccitabilità corticale durante periodi di veglia prolungata: Badawy *et al.* (2006) hanno osservato una riduzione della SICI ed un incremento dell'ICF in pazienti epilettici, e recentemente un decremento della SICI è stato confermato in soggetti normali (Kreuzer *et al.*, 2011).

De Gennaro *et al.* (2007) hanno valutato i cambiamenti nell'eccitabilità corticale e corticospinale in funzione della privazione di sonno mediante l'utilizzo dell'EEG e della TMS ad impulsi appaiati con differenti ISI, in 33 soggetti normali prima e dopo 40 ore di privazione. I risultati mostrano che, in seguito a privazione di sonno, la potenza EEG nel *range* delle basse frequenze esibisce sempre il suo massimo nelle regioni fronto-centrali, indicando che tali aree sono particolarmente vulnerabili agli effetti negativi della privazione di sonno. Per quanto riguarda l'eccitabilità corticale e corticospinale, gli autori hanno osservato che l'assenza di sonno influenzava gli effetti della TMS in diversi modi, con un decremento dell'eccitabilità corticospinale ed un incremento della facilitazione intracorticale (sebbene limitato ai soggetti di sesso femminile). Inoltre, la soglia

motoria standardizzata, la soglia inferiore e la soglia superiore mostravano un significativo incremento in seguito alla deprivazione di sonno.

Sebbene le soglie motorie riflettano l'eccitabilità del sistema corticospinale, e l'esatto *locus* di cambiamento nell'eccitabilità lungo la via corticospinale non possa essere determinato, parte dell'incremento osservabile dopo deprivazione di sonno dovrebbe essere spiegato grazie al contributo di fattori periferici. Un dato cruciale a favore di questa interpretazione è che la topografia EEG corticale della sonnolenza, indicata dall'incremento dell'attività *theta*, è negativamente correlata con i cambiamenti nella soglia motoria: ciò significa che una maggiore propensione al sonno associata all'incremento fronto-centrale della potenza della banda *theta* viene predetta da minori differenze nelle soglie motorie registrate prima e dopo la deprivazione di sonno. Quindi, un relativo incremento dell'eccitabilità corticospinale espressa dal parallelo incremento delle tre differenti misure delle soglie motorie è correlata ad un'accresciuta attività EEG a bassa frequenza, caratteristica di stati di profonda sonnolenza, e questa "doppia faccia" dell'eccitabilità corticospinale sembra compatibile con l'interpretazione di un generale effetto della sonnolenza sulle risposte motorie periferiche, mentre le componenti corticali del sistema motorio coinvolte nelle misure della soglia motoria sembrano mostrare quantomeno un'attivazione inalterata. Tale dissociazione tra componenti centrali e periferiche del sistema motorio è stata riscontrata al risveglio dal sonno REM, con incremento dell'eccitabilità corticale parallelo all'inibizione spinale di questo stadio (De Gennaro *et al.*, 2004a,b).

E' interessante il risultato relativo all'incremento della facilitazione corticale nei soggetti di sesso femminile (con ISI tra i 7 ed i 15 ms). Si pensa che la SICF rifletta l'attivazione degli interneuroni eccitatori mediata dai recettori glutammaterigci NMDA (Liepert *et al.*, 1997; Ziemann *et al.*, 1996; 1998;

Schwenkreis *et al.*, 2000). I livelli di glutammato aumentano nel cervello del topo e dell'uomo dopo deprivazione di sonno (Bettendorff *et al.*, 1996; Murck *et al.*, 2002; Sallanon-Moulin *et al.*, 1994). Un'aumentata trasmissione glutammatergica potrebbe essere responsabile sia per l'elevata facilitazione corticale durante la veglia prolungata che per il potenziamento della forza sinaptica dovuto ad LTP, associato a cambiamenti plastici avvenuti durante la veglia (Klintsova e Greenough, 1999; Knott *et al.*, 2002; Cirelli e Tononi, 2000; Cirelli *et al.*, 1996). L'incrementata facilitazione corticale in soggetti deprivati di sonno, quindi, supporterebbe l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica", la quale prevede che i processi di apprendimento e plasticità durante la veglia siano connessi ad un netto incremento della forza sinaptica in diversi circuiti corticali (Tononi e Cirelli, 2003; 2006). Complessivamente, la forza delle connessioni intracorticali raggiunge il massimo verso la fine del giorno. L'ipotesi prevede che l'ampiezza dei potenziali evocati dalla TMS sia minore dopo una notte di sonno, maggiore alla fine di un giorno di veglia e dovrebbe aumentare ulteriormente dopo una deprivazione prolungata di sonno. In questo studio, tale previsione è stata confermata quantomeno per le donne.

La coesistenza di una maggiore sincronizzazione dell'EEG e di una maggiore eccitabilità corticale è coerente con un fenomeno ben conosciuto, ovvero l'aumento della propensione a crisi epilettiche durante deprivazione di sonno (Malow, 2004). Per questa ragione, in elettroencefalografia clinica, la deprivazione di sonno viene solitamente utilizzata come un test di induzione e viene, inoltre, considerata un fattore di rischio/precipitante delle crisi anche nei pazienti epilettici sottoposti ad efficaci trattamenti farmacologici (Dinner, 2002). L'aumento dell'eccitabilità corticale a seguito di deprivazione di sonno nei pazienti epilettici è stato rilevato recentemente attraverso l'utilizzo della TMS (Badawy *et al.*, 2006).

La maggior parte degli studi che hanno esaminato gli effetti della deprivazione di sonno sulle variazioni di eccitabilità corticale, ha utilizzato in modo combinato TMS ed EMG al fine di registrare le variazioni d'ampiezza dei MEP (Badawy *et al.*, 2006; Civardi *et al.*, 2001; De Gennaro *et al.*, 2007; Manganotti *et al.*, 2001; 2006) Recentemente, Huber *et al.* (2012) hanno cercato di valutare come la deprivazione di sonno influenzi la responsività corticale per mezzo dell'uso combinato di TMS ed EEG, registrando i potenziali evocati dalla TMS (*TMS evoked potentials* – TEP) in corteccia frontale. Secondo gli autori, tale approccio sarebbe da considerare come complementare all'utilizzo dei MEP, permettendo di catturare differenti aspetti dell'eccitabilità corticale. Nel caso specifico, gli autori ipotizzano che la registrazione dei TEP sarebbe in grado di valutare la responsività dei neuroni corticali in un modo molto simile a quello classicamente utilizzato negli studi animali (stimolazione elettrica combinata con la registrazione dei potenziali di campo), misurando l'immediata risposta elettrica corticale ad una stimolazione trans-sinaptica. I risultati mostrano come l'ampiezza e l'inclinazione dei TEP precoci (10-20 ms) incrementavano significativamente in seguito ad una notte di deprivazione di sonno, e ritornavano a dei livelli di *baseline* dopo una notte di sonno di recupero. Tale dato indicherebbe che la veglia è associata con un progressivo incremento dell'eccitabilità corticale nell'uomo, che viene riequilibrato durante il sonno. Gli autori ipotizzano che alla base di tali modificazioni nell'eccitabilità corticale vi siano delle modulazioni plastiche in termini di LTP ed LTD.

Infine, Del Felice *et al.* (2011) hanno osservato, in seguito a deprivazione di sonno, un incremento di componenti più tardive (P100 e N190) dei TEP in soggetti sani ed in misura maggiore in pazienti con epilessia mioclonica giovanile, particolarmente evidente sulle aree corticali anteriori. Inoltre, tale incremento dell'eccitabilità corticale nei pazienti epilettici era osservabile anche durante il sonno

di recupero. Tale fenomeno potrebbe essere connesso con la disfunzione del circuito cortico-talamico che si pensa sia alla base dell'epilessia mioclonica.

Questi dati, complessivamente, sono coerenti con l'ipotesi di "Omeostasi sinaptica" (Tononi e Cirelli, 2003; 2006): l'aumento della propensione al sonno che fa seguito a periodi prolungati di veglia sarebbe accompagnato da un aumento dell'eccitabilità corticale, espresso, nei paradigmi sperimentali, in termini di incremento dell'ampiezza dei MEP (De Gennaro *et al.*, 2007) e dei TEP (Del Felice *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2012), mentre il sonno sarebbe associato ad un ritorno dell'eccitabilità corticale a valori di *baseline* (Huber *et al.*, 2012).

CAPITOLO 3

LA RICERCA

3.1 Introduzione

Come discusso nel precedente capitolo, numerose evidenze suffragano l'ipotesi secondo cui le modificazioni plastiche che si verificano durante la veglia nel cervello umano siano direttamente legate all'entità del potenziamento sinaptico mediato da meccanismi di LTP all'interno di specifici circuiti neurali. Questa riorganizzazione sinaptica dovrebbe verificarsi durante il sonno, principalmente durante il sonno ad onde lente, permettendo un attivo *downscaling* sinaptico, che risulta essenziale per l'ottimale funzionamento cellulare ed associato ai guadagni nella *performance* dopo una notte di sonno (Tononi e Cirelli, 2006). Ciò è stato recentemente dimostrato nell'uomo attraverso un protocollo *LTP-like*. Il potenziamento sinaptico nella corteccia motoria durante la veglia indica cambiamenti nella regolazione regionale del sonno, espressa dall'attività EEG sincronizzata (De Gennaro et al., 2008; Bergmann *et al.*, 2008).

Quello che ancora manca è una dimostrazione diretta che anche la dinamica dei cambiamenti diurni del LTP confermi l'ipotesi dell'Omeostasi Sinaptica (Tononi e Cirelli, 2006). Infatti, seppur l'attività EEG sincronizzata durante il sonno non-REM sembri effettivamente rappresentare il *milieu* neurofisiologico (e neurochimico) che permette la *downregulation* dei pesi sinaptici potenziati durante i periodi di veglia, non risulta ancora chiaro in che modo la durata della veglia regoli i cambiamenti dell'eccitabilità corticale. Molti studi sembrano effettivamente andare nella direzione di un incremento dell'eccitabilità corticale in seguito a deprivazione di sonno sia in soggetti sani (De Gennaro *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2012; Kreuzer *et al.*, 2011) che in pazienti epilettici (Badawy *et al.*, 2006), mentre altri non trovano alcuna

significativa modulazione dell'eccitabilità corticale in funzione del tempo trascorso in veglia (Manganotti *et al.*, 2001; Doeltgen e Ridding, 2010) o mostrano risultati contrastanti (Civardi *et al.*, 2001). E' importante osservare come nessuno di questi studi abbia cercato di esaminare gli effetti della deprivazione di sonno sulla responsività corticale in aree diverse dalle corteccie motorie primaria e associativa. L'unico lavoro che ha valutato le modificazioni di eccitabilità in corteccia somatosensoriale in seguito a veglia prolungata mostrava un incremento dell'ampiezza delle componenti precoci dei SEP in funzione delle ore trascorse in veglia, ma non teneva conto della possibile influenza di fattori circadiani (Terney *et al.*, 2005). I risultati di un recentissimo studio sui ratti (Vyazovskiy *et al.*, 2012), inoltre, sembrano indicare un maggior incremento dell'eccitabilità corticale nell'area parietale piuttosto che in quella frontale in seguito a perdita di sonno.

L'eventuale progressivo incremento dell'eccitabilità corticale dovrebbe risultare associato a cambiamenti di efficacia sinaptica, principalmente indotti da meccanismi di LTP in specifici circuiti neurali, che dovrebbero però raggiungere una 'saturazione' qualora l'aumento della forza sinaptica raggiunga un certo limite. Questa previsione rappresenta, dunque, una diretta conseguenza dell'assunzione che la funzione del sonno sia quella di produrre un *downscaling* della forza sinaptica verso un livello di base, che risulti sostenibile dal punto di vista energetico e benefico per l'apprendimento e la memoria delle attività diurne, permettendo anche di apprendere nuovamente il giorno successivo (Tononi e Cirelli, 2006). Un temporaneo arresto della plasticità corticale, basata sul LTP, è stato riscontrato negli esseri umani (Stefan *et al.*, 2006) e nei ratti (Rioult-Pedotti *et al.*, 2000; Monfils *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2005). Nei ratti, un blocco del LTP è stato anche rilevato dopo periodi di veglia prolungata (Vyazovskiy *et al.*, 2008).

L'aumento progressivo del tempo trascorso in veglia durante un protocollo di deprivazione di sonno dovrebbe essere associato, dunque, a differenti dinamiche dell'eccitabilità corticale, delle oscillazioni cerebrali EEG e di cambiamenti LTP.

L'ipotesi prevede:

1. Un progressivo incremento di eccitabilità corticale, in termini di ampiezza delle risposte corticali a seguito di stimolazione sensoriale; verosimilmente, questo incremento dovrebbe essere lineare.
2. Un progressivo incremento della densità di potenza EEG nel *range* delle frequenze lente.
3. Variazioni plastiche indotte da meccanismi LTP dovrebbero essere al massimo livello al mattino dopo il risveglio e al minimo (o annullate) verso la fase finale della deprivazione di sonno.

Il presente esperimento è finalizzato a valutare direttamente queste ipotesi mediante un protocollo di deprivazione di sonno che utilizzi congiuntamente registrazioni delle topografia EEG ed il protocollo PAS, in grado di produrre cambiamenti *LTP-like* nell'uomo (Walters *et al.*, 2005). Il paradigma PAS somatosensoriale risulta utile per valutare sia i cambiamenti nell'eccitabilità corticale che il potenziamento *LTP-like*. I potenziali evocati somatosensoriali pre-PAS permettono di quantificare i livelli di eccitabilità corticale, mentre le differenze pre-*vs.* post-PAS forniscono una misura del potenziamento corticale provocato da meccanismi *LTP-like*.

L'obiettivo principale del presente studio è valutare, in soggetti normali, gli effetti di una notte di deprivazione di sonno su:

1. una misura elettrofisiologica di sonnolenza, fornita dalla topografia EEG di veglia ad occhi chiusi e ad occhi aperti;

2. una misura di eccitabilità corticale, fornita da componenti precoci dei SEP in corteccia somatosensoriale e dalle variazioni nella topografia corticale dei voltaggi EEG associati ai SEP;
3. una misura del potenziamento corticale, fornita dalla differenza pre- vs. post-PAS, cioè dai cambiamenti dell'ampiezza della componente N20-P25 dei SEP, misurata dopo un protocollo che combina stimolazione ripetitiva del nervo mediano con la TMS sulla regione post-centrale controlaterale.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Soggetti

Sedici soggetti sani, di sesso maschile e destrimani hanno partecipato all'esperimento (età media 23.3 ± 2.5 anni). Nessuno dei soggetti riportava danni periferici o neurologici. In particolare, i criteri di esclusione erano: lesione cerebrale, abuso di alcool o droghe e controindicazioni alla TMS (Wassermann, 1998). Inoltre, sono stati richiesti come criteri di inclusione: abitudini e durata di sonno normale (24.00-8.00 ± 1 h), assenza di abitudine a sonnellini diurni, assenza di eccessiva sonnolenza diurna, assenza di altri disturbi del sonno, medici o psichiatrici, valutati tramite diario del sonno settimanale, somministrazione del Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI - Buysse *et al.*, 1989) e un'intervista clinica. Ai partecipanti è stato richiesto di evitare sonnellini diurni. La *compliance* alle istruzioni sperimentali è stata controllata attraverso registrazioni attigrafiche (AMI *Mini motion logger*). Poiché l'obiettivo principale era quello di valutare i cambiamenti LTP-like per mezzo del protocollo PAS nel corso di una notte di deprivazione di sonno (DS), e dato che tale protocollo è caratterizzato da una notevole variabilità interindividuale (Pellicciari *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2008), l'ultimo criterio di inclusione era rappresentato dalla presenza di un chiaro incremento d'ampiezza del complesso N20-

P25 dei SEP come conseguenza del protocollo PAS, valutato nel corso di una sessione preliminare precedente all'esperimento vero e proprio. Pellicciari *et al.*, (2009), in seguito al protocollo PAS, hanno osservato in soggetti giovani un incremento dell'ampiezza del complesso N20-P25 di circa il 5.4%. In accordo con questo risultato, nel presente studio la presenza di un incremento post-PAS del complesso N20-P25 del 5.4% è stata richiesta come criterio di inclusione. Nella sessione di reclutamento, i 16 soggetti hanno mostrato un incremento medio del complesso N20-P25 del 27.4 %.

A tutti i soggetti è stato fornito un consenso informato scritto e lo studio è stato effettuato in accordo con la Dichiarazione di Helsinki ed approvato dal Comitato Etico del Dipartimento di Psicologia.

3.2.2 Procedura

Disegno sperimentale

I partecipanti allo studio sono stati continuamente monitorati durante circa 40 ore di veglia prolungata, durante le quali sono stati sottoposti a 4 sessioni sperimentali alla stessa ora (11.00 e 23.00) del primo e del secondo giorno, allo scopo di valutare l'eventuale influenza di fattori circadiani. Ogni sessione durava circa 40 minuti ed era caratterizzata da:

- 1 - valutazione della sonnolenza soggettiva;
- 2 - registrazione dell'EEG di veglia: 5 minuti ad occhi chiusi (OC) e 5 minuti ad occhi aperti (OA);
- 3 – registrazione dei SEP pre-PAS;
- 4 - protocollo PAS;
- 5 – registrazione dei SEP post-PAS;
- 6 - valutazione della sonnolenza comportamentale.

Durante le sessioni sperimentali, i partecipanti erano seduti su una sedia confortevole, all'interno di una cabina insonorizzata, a temperatura controllata ed elettricamente isolata tramite una gabbia di Faraday. Ai soggetti è stato richiesto di mantenere il loro braccio destro completamente rilassato e di prestare attenzione alla mano stimolata durante il protocollo PAS (Stefan *et al.*, 2004).

Nel corso dell'intero esperimento, ogni due ore a partire dalle 11.00 del primo giorno è stata rilevata la temperatura timpanica ed è stato valutato il livello di sonnolenza soggettiva.

Quando non impegnati nelle sessioni di test, ai soggetti era permesso svolgere le attività che preferivano, quali leggere, scrivere, ascoltare musica, guardare la TV o giocare, sempre sotto la diretta supervisione di almeno uno sperimentatore; non era permesso loro di stare sdraiati, dormire o svolgere attività fisiche intense. I pasti erano previsti alle ore 08:30, 14:30 e 19:30. Erano permessi spuntini non programmati, ma non era consentito assumere bevande caffeinate, cioccolata, alcool e medicinali che potevano in qualche modo influenzare la sonnolenza durante il protocollo di DS. L'informazione relativa all'ora del giorno era disponibile per i soggetti, e l'esposizione alla luce non era strettamente controllata (sebbene il laboratorio fosse costantemente illuminato da 4 lampade al neon, le tapparelle attenuavano solo in parte la luce proveniente dall'esterno). Le 40 ore di veglia prolungata terminavano alle 24:00 del secondo giorno.

Sonnolenza soggettiva

La sonnolenza soggettiva è stata misurata attraverso la ***Karolinska Sleepiness Scale*** (KSS; Akerstedt e Gillberg, 1990) e la **Scala Visuo Analogica per il Vigore Globale** (VAS; Monk, 1987), nella fase precedente l'inizio di ogni sessione di registrazione EEG (vedi di seguito) ed ogni due ore nel corso dell'intero esperimento. La *Karolinska Sleepiness Scale* (KSS) è una scala a 9

livelli, che va da “molto vigile” a “molto sonnolento”; mentre la Scala Visuo Analogica per il Vigore Globale è una misura carta-e-matita per valutare la vigilanza soggettiva che somma i punteggi ottenuti da quattro sottoscale (stanchezza, sonnolenza, energia e concentrazione), ciascuna di 10 cm, allo scopo di ottenere un punteggio di Vigore Globale compreso tra 0 e 40 cm.

Stimolazione elettrica somatosensoriale

La stimolazione elettrica del nervo usata per indurre i SEP è stata effettuata per mezzo di un elettrodo bipolare (catodo prossimale) connesso ad un elettromiografo (MYto, EBNeuro, Italy). L'elettrodo di stimolazione veniva posizionato sul nervo mediano destro all'altezza del polso. La stimolazione del nervo mediano avveniva tramite uno stimolo elettrico della durata di 200 μ s, con una frequenza di 3 Hz e con un'intensità di stimolazione del 300% rispetto alla soglia sensoriale individuale (Wolters *et al.*, 2005). L'area di rappresentazione della mano stimolata nella corteccia somatosensoriale primaria (*hot-spot* somatosensoriale) veniva marcata 2 cm posteriormente a C3, corrispondente alla derivazione Cp3 (Nuwer *et al.*, 1994; Wolters *et al.*, 2005; Litvak *et al.*, 2007). Prima e dopo la procedura PAS venivano registrate le risposte corticali a 500 stimoli elettrici (500 pre-PAS + 500 post-PAS). Durante il PAS venivano utilizzati gli stessi parametri di stimolazione del nervo mediano.

Stimolazione magnetica transcranica

La TMS è stata applicata utilizzando uno stimolatore magnetico Magstim 200 Monopulse connesso ad un modulo Bistim ed un *coil* a forma di otto con un diametro esterno di 9 cm (Magstim Company Limited, UK). Il campo magnetico erogabile da questo tipo di *coil* è pari a 2.0 T. Il *coil* veniva posizionato in direzione tangenziale allo scalpo con il manico rivolto posteriormente e lateralmente, a formare un angolo di 45° con l'asse medio-sagittale della testa del soggetto. Il sito ottimale di

stimolazione per elicitare i potenziali evocati motori (MEP) nel muscolo adduttore *pollicis brevis* (APB) destro, denominato 'hot-spot motorio', veniva scelto posizionando approssimativamente il *coil* sul solco centrale e muovendolo sullo scalpo di circa 0.5 cm per volta sull'area M1 della corteccia sinistra, stimolando ad un'intensità moderatamente sopra-soglia, e marcato per mezzo di un pennarello. In corrispondenza di tale *hot-spot* motorio veniva determinata la soglia motoria a riposo (*resting motor threshold*, RMT), ovvero la minima intensità di stimolazione necessaria per produrre una risposta di almeno 50 μ V di ampiezza in APB in almeno 5 di 10 stimolazioni consecutive ad una risoluzione pari al 1% del massimo output dello stimolatore (Rossini *et al.*, 1994). Il completo rilassamento muscolare veniva monitorato per tutta la durata della sessione sperimentale e regolato tramite *feedback* audiovisivo.

Stimolazione associativa appaiata

Il protocollo PAS riproduce la procedura sperimentale di Wolters *et al.* (2005), esemplificata nella Fig. 1, che rappresenta una modifica del protocollo PAS utilizzato per la corteccia motoria (Stefan *et al.*, 2000).

Il protocollo consiste in una singola stimolazione elettrica erogata sul nervo mediano destro a livello del polso al 300% della soglia sensoriale, seguita da TMS erogata su S1, in corrispondenza della derivazione CP3. Gli stimoli magnetici venivano erogati ad un'intensità del 130% della soglia motoria a riposo. L'intervallo tra la stimolazione del mediano ed il successivo stimolo magnetico era definito sulla base della latenza della N20 (Wolters *et al.*, 2005). Venivano erogate 140 coppie di stimoli a 0.1 Hz per una durata complessiva di 25 min. Durante il PAS si richiedeva ai soggetti di guardare la loro mano destra, poiché è stato dimostrato che tale condizione consente la massima plasticità cerebrale indotta dal PAS (Stefan *et al.*, 2004).

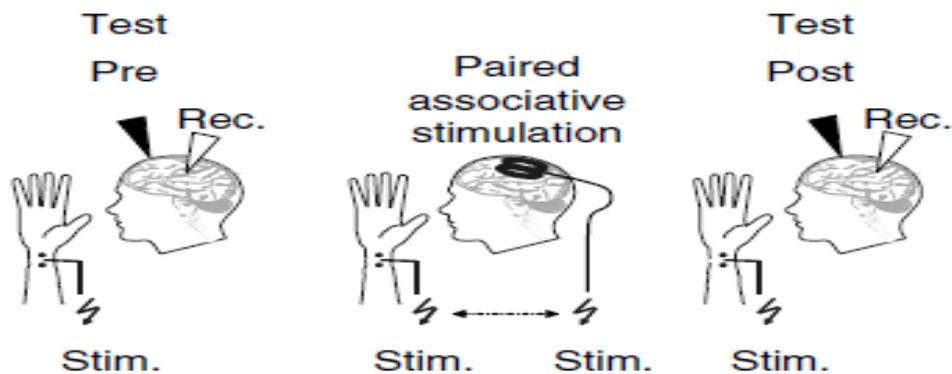


Figura 1: *Illustrazione del protocollo PAS.*

Registrazioni poligrafiche

1) EEG di veglia

Per le registrazioni poligrafiche è stato utilizzato un poligrafo Esaote Biomedica VEGA 24. I segnali elettroencefalografici sono stati registrati tramite 20 elettrodi ad anello sinterizzati Ag/AgCl montati su una cuffia elastica (EasyCap GmbH, Herrsching, Germany) in corrispondenza delle 19 derivazioni unipolari del sistema internazionale 10-20 (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, Fz, C3, C4, Cz, P3, P4, Pz, T3, T4, T5, T6, O1, O2) con l'aggiunta di un elettrodo in corrispondenza del *hot-spot* somatosensoriale (Cp3). Tutti gli elettrodi posizionati sullo scalpo erano riferiti ai mastoidei giuntati (A1-A2). I segnali EEG venivano filtrati con una costante di tempo di 0.3 sec per il passa-alto e a 30 Hz per il passa-basso. L'EOG orizzontale bipolare veniva registrato con una costante di tempo di 1 sec. attraverso elettrodi posizionati a circa 1 cm dal canto mediale e laterale dell'occhio dominante. Tutti i segnali EEG, EOG ed EMG sono stati acquisiti con una frequenza di campionamento di 128 Hz. Le impedenze di tutti gli elettrodi erano inferiori a 5 K Ω .

2) Registrazione dei SEP

Lo stesso montaggio utilizzato per le registrazioni EEG è stato utilizzato anche per rilevare i SEPs. I segnali cerebrali sono stati acquisiti ad una frequenza di campionamento di 5 kHz e filtrati a 0.03-1500 Hz. Per il controllo e la rimozione di artefatti oculari dall'attività EEG sono stati rilevati, attraverso la registrazione dell'elettrooculogramma (EOG), i movimenti oculari orizzontali. L'attività EMG superficiale veniva registrata dal muscolo APB destro con l'elettrodo attivo posizionato sul muscolo e l'elettrodo di referenza sulla giunzione metacarpo-falangea del pollice.

Valutazione della sonnolenza a livello comportamentale

Alla fine di ogni sessione sperimentale SEP-PAS veniva somministrata una versione di 5 minuti dello *Psychomotor Vigilance Task* (PVT, Dinges e Powell, 1985) come misura comportamentale della sonnolenza. In questo compito al soggetto appare sullo schermo del PC un contatore fermo sullo 0. Il contatore si attiva automaticamente a intervalli irregolari di tempo, ed ogni volta il soggetto deve arrestarlo quanto più rapidamente tramite un *click* del *mouse*. Il PVT è un noto ed attendibile compito computerizzato per la valutazione dell'attenzione sostenuta (Dinges e Powell, 1985; Jewett *et al.*, 1999), non è influenzato da effetti di apprendimento ed è sensibile alle variazioni della *performance* in seguito a DS di sonno (Dinges *et al.*, 1997; Doran *et al.*, 2001; Van Dongen *et al.*, 2003). La misura fondamentale presa in considerazione era la mediana dei tempi di reazione (TR).

3.2.3 Analisi dei dati

Sonnolenza soggettiva

Ciascuna delle misure auto-riferite di sonnolenza (KSS e VAS) è stata sottoposta ad un'ANOVA a due vie per misure ripetute, Giorno (pre-DS vs. post-DS) X Ora del Giorno (11.00 vs. 23.00).

Sonnolenza comportamentale

I cambiamenti nella prestazione al PVT come conseguenza della DS sono stati valutati per mezzo di un'ANOVA a due vie per misure ripetute, Giorno (pre-DS vs. post-DS) X Ora del Giorno (11.00 vs. 23.00), effettuata sulle mediane dei TR.

Variazioni topografiche dell'EEG di veglia in seguito a deprivazione di sonno

L'analisi delle variazioni della topografia EEG corticale è stata effettuata con lo scopo di controllare che, a livello elettroencefalografico, la DS provocasse gli ormai classici effetti descritti in letteratura, ovvero un generalizzato incremento delle frequenze lente, prevalentemente nelle aree fronto-centrali all'altezza della linea mediana (Cajochen *et al.*, 2002; De Gennaro *et al.*, 2007; Finelli *et al.*, 2000; Tinguely *et al.*, 2006). Gli artefatti sono stati eliminati *off-line* attraverso un'ispezione visiva effettuata a 2-sec. L'analisi spettrale delle 20 derivazioni corticali è stata effettuata tramite la *Fast Fourier Transform* su epoche consecutive di 2 sec, con una risoluzione di frequenza di 1 Hz, separatamente per la condizione ad OC e ad OA, per le seguenti bande: *delta* (1-4 Hz) e *theta* (5-7 Hz). Gli effetti della DS su ciascuna banda di frequenza in ogni derivazione corticale sono stati valutati per mezzo di t di Student a due code per campioni appaiati, relativamente e sessioni equivalenti a livello circadiano (11.00 pre-DS vs. 11.00 post-DS; 23.00 pre-DS vs. 23.00 post-DS). A causa dell'elevato numero di confronti è stato applicato il *False Discovery Rate* come correzione per comparazioni multiple (Storey *et al.*, 2004).

Analisi delle componenti precoci dei SEP

Il sito ottimale per l'analisi delle componenti precoci dei SEP pre-PAS, allo scopo di valutare le variazioni di eccitabilità corticale, era l'elettrodo Cp3, ma

abbiamo considerato anche le derivazioni adiacenti C3 e P3. Tutti i dati raccolti sono stati divisi in epoche che andavano da -32 a +88 ms rispetto alla stimolazione del nervo mediano. Le epoche contenenti artefatti sono state reiettate dopo un'analisi visiva *off-line*. Per ogni registrazione, la *baseline* è stata calcolata mediando tutti i campioni compresi tra -50 e -4 ms. La finestra temporale per la detezione delle singole componenti è stata decisa in seguito ad un'ispezione visiva delle singole registrazioni. L'ampiezza della P14 è stata calcolata come la differenza tra la *baseline* ed il primo picco positivo con latenza 14-20 ms per Cp3, 14-18 ms per C3 e 12-20 ms per P3. L'ampiezza della N20 è stata calcolata come la differenza tra la *baseline* ed il primo picco negativo con latenza 18-26 ms per Cp3, 18-24 ms per C3 e P3. L'ampiezza della P25 è stata calcolata come la differenza tra la *baseline* ed il primo picco positivo con latenza 22-30 ms per Cp3, 20-30 ms per C3 e P3. L'ampiezza della N30 è stata calcolata come la differenza tra la *baseline* ed il primo picco negativo con latenza 28-34 ms per Cp3, 28-36 ms per C3 e P3. L'ampiezza della P40 è stata calcolata come la differenza tra la *baseline* ed il primo picco negativo con latenza 32-62 ms per Cp3, 32-68 ms per C3 e 32-56 ms per P3. Per ogni componente dei SEP pre-PAS in ciascuna delle derivazioni considerate è stata eseguita un'ANOVA a due vie per misure ripetute, Giorno (pre-DS vs. post-DS) X Ora del Giorno (11.00 vs. 23.00).

Topografia dei SEP

La detezione delle componenti precoci dei SEP può essere molto difficile in derivazioni corticali lontane dall'area S1: non tutte le componenti possono essere identificate in modo attendibile in tutte le derivazioni corticali. Per questa ragione, l'analisi relativa alle variazioni topografiche di eccitabilità corticale è stata eseguita sui voltaggi EEG associati ai SEP piuttosto che sulle singole componenti. Tutte le registrazioni dei SEP pre-PAS sono state trasformate in punteggi z e divise in *bin*

temporali da 1 ms ciascuno, da 10 a 69 ms (la finestra temporale all'interno della quale sono state osservate tutte le componenti descritte nella sezione 'analisi delle componenti precoci dei SEP'). La comparazione statistica tra SEP pre- e post-DS in tutti i *bin* temporali per ogni derivazione corticale è stata effettuata tramite t di Student per campioni appaiati a due code. A causa dell'elevato numero di confronti è stato applicato il *False Discovery Rate* come correzione per comparazioni multiple (Storey *et al.*, 2004).

Effetti del PAS sulle componenti precoci dei SEP dopo deprivazione di sonno

La principale variabile dipendente per la valutazione dell'influenza del PAS sui SEP in seguito a DS era rappresentata dall'ampiezza del complesso N20-P25 in Cp3, calcolato come la differenza tra il primo picco negativo tra 18 e 24 ms (N20) ed il primo picco positivo tra 22 e 30 ms (P25). Sono state considerate anche le derivazioni adiacenti C3 e P3. Per ogni sessione sperimentale, i cambiamenti nell'ampiezza dei SEP in seguito al protocollo PAS erano espressi in termini di *ratio* tra ampiezza del complesso N20-P25 pre- e post-PAS. Tali cambiamenti sono stati comparati tramite un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie per misure ripetute, Giorno (pre-DS vs. post-DS) X Ora del Giorno (11.00 vs. 23.00) per ciascuna delle tre derivazioni prese in considerazione. La stessa ANOVA è stata eseguita per le singole componenti N20 e P25.

3.3 Risultati

3.3.1 Andamento delle variazioni soggettive di sonnolenza lungo le 40 ore

Nella Fig. 2 sono riportate sinteticamente le variazioni delle misure soggettive di sonnolenza rilevate a intervalli regolari di 2 ore nel corso dell'intero esperimento, raffrontate con le oscillazioni della temperatura timpanica. L'obiettivo principale della rilevazione della temperatura timpanica era quello di fornire un

ancoraggio ad una variabile notoriamente soggetta a variazioni di tipo circadiano. Effettivamente, dal grafico si evince una chiara fluttuazione circadiana della temperatura timpanica, con picchi massimi nel tardo pomeriggio e minimi nelle prime ore del mattino. Per quanto riguarda la sonnolenza soggettiva, si osserva come le due misure (KSS e VAS) risultino sostanzialmente sovrapponibili ed indichino un progressivo aumento della sonnolenza autopercepita, sebbene influenzato da fattori di tipo circadiano, mostrando un andamento in opposizione di fase con quello della temperatura timpanica: entrambe le scale, infatti, raggiungono lo *zenit* in prossimità dei picchi minimi di temperatura ed il *nadir* in prossimità dei picchi massimi di temperatura.

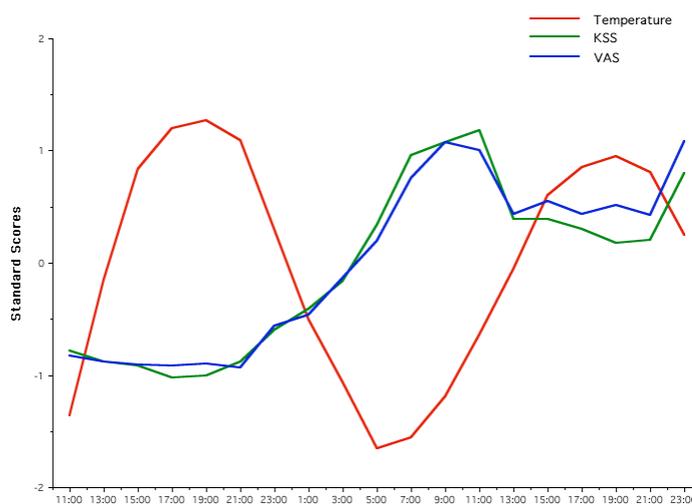


Figura 2. Andamento delle variazioni di sonnolenza soggettiva, valutato tramite Karolinska Sleepiness Scale (KSS) e Scala Visuo-Analogica per il Vigore Globale (VAS) confrontato con le variazioni di temperatura timpanica nel corso dell'intero esperimento.

3.3.2 Analisi delle variazioni soggettive di sonnolenza in corrispondenza delle 4 sessioni sperimentali

I soggetti sperimentali erano significativamente più sonnolenti in seguito a DS (Fig. 3A), come indicato dalla presenza di un significativo effetto principale del Giorno sui punteggi della KSS (Pre-SD=4.37 SE=±0.46; Post-SD=7.12 SE=±0.40; $F_{1,15}=26.69$; $p=0.0001$). Era presente anche un effetto significativo dell'Ora del Giorno ($F_{1,15}=6.75$; $p=0.02$), con punteggi KSS più elevati al mattino (11.00 a.m.=6.12 SE=±0.39; 11.00 p.m.=5.37 SE=±0.35), ma era caratterizzato da un basso *effect size* ($\eta^2=0.04$). L'interazione non era significativa.

Un significativo effetto principale del Giorno è stato osservato anche per la VAS ($F_{1,15}=48.59$; $p=0.000005$), con punteggi VAS più elevati in seguito a DS (Pre-SD=14.18 SE=±1.44; Post-SD=27.38 SE=±1.58), risultato che indica come i soggetti fossero anche meno vigili dopo DS (Fig. 3B). Sono stati osservati anche l'effetto principale dell'Ora del Giorno (11.00 a.m.=19.96 SE=±1.30; 11.00 p.m.=21.59 SE=±1.17; $F_{1,15}=4.38$; $p=0.054$) e l'interazione ($F_{1,15}=4.71$; $p=0.05$), ma l'entità di questi effetti era molto marginale, al limite della significatività.

3.3.3 Analisi delle variazioni comportamentali di sonnolenza in corrispondenza delle 4 sessioni sperimentali

Come illustrato in Figura 3C la prestazione al PVT era significativamente peggiore (TR più alti) dopo DS (Pre-SD=132.83 SE=±2.12 ms; Post-SD=142.52 SE=±2.78 ms; $F_{1,15}=12.16$; $p=0.003$), mentre non sono stati osservati effetti significativi dell'Ora del Giorno o dell'interazione ($F<2$).

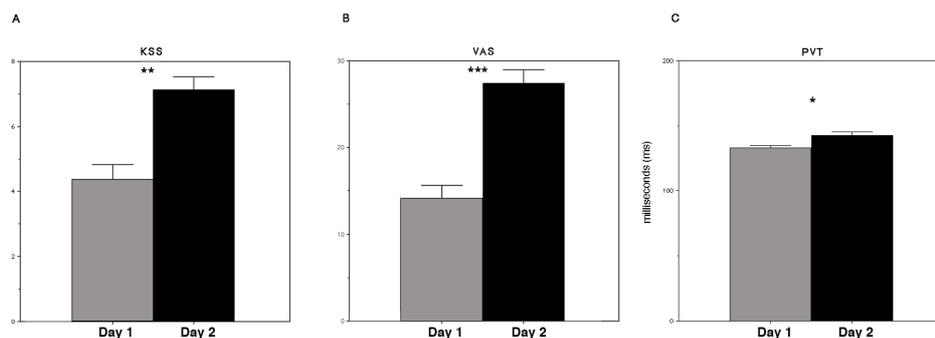


Figura 3: Effetto della deprivazione di sonno sulle misure di sonnolenza soggettiva e comportamentale (* $p < 0.005$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.00001$). **A.** Punteggi medi alla Karolinska Sleepiness Scale (KSS) durante il giorno prima (barra grigia) e dopo (barra nera) DS. **B.** Punteggi medi alla Scala Visuo-Analogica per il Vigore Globale (VAS) durante il giorno prima (barra grigia) e dopo (barra nera) DS. **C.** Tempi di reazione medi (espresso in ms) al Psychomotor Vigilance Task (PVT) durante il giorno prima (barra grigia) e dopo (barra nera) DS.

3.3.4 EEG di veglia

Per quanto riguarda l'andamento delle bande di frequenza EEG *delta* e *theta* in seguito a DS di sonno, la Fig. 4 illustra le distribuzioni topografiche dei confronti statistici (t di Student) eseguiti per ciascuna derivazione corticale tra sessioni equivalenti a livello circadiano (3 vs. 1 e 4 vs. 2) nelle condizioni ad occhi chiusi (OC) e ad occhi aperti (OA). Nella condizione ad OC si osserva un significativo incremento del *delta* e del *theta* in seguito a DS di sonno su tutta la topografia corticale ($q \leq 0.0003$; $p \leq 0.03$ corrispondente a $t \geq 2.38$), ad eccezione della derivazione T3 dove non si osservano variazioni significative del *theta* nel confronto tra le due sessioni serali (4 vs. 2). Mentre l'incremento del *theta* prevale in aree fronto-centrali, il *delta* mostra un incremento più omogeneo al mattino ed una prevalenza in aree centro-posteriori nella sessione serale. Nella condizione ad OA il *delta* ed il *theta* incrementano significativamente in tutte le derivazioni corticali ($q \leq 0.0003$; $p \leq 0.03$ corrispondente a $t \geq 2.35$). Anche in questo caso, il *theta* incrementa maggiormente in aree centro-frontali, mentre l'incremento del *delta*, quantomeno nella sessione serale, sembra interessare prevalentemente regioni centro-posteriori.

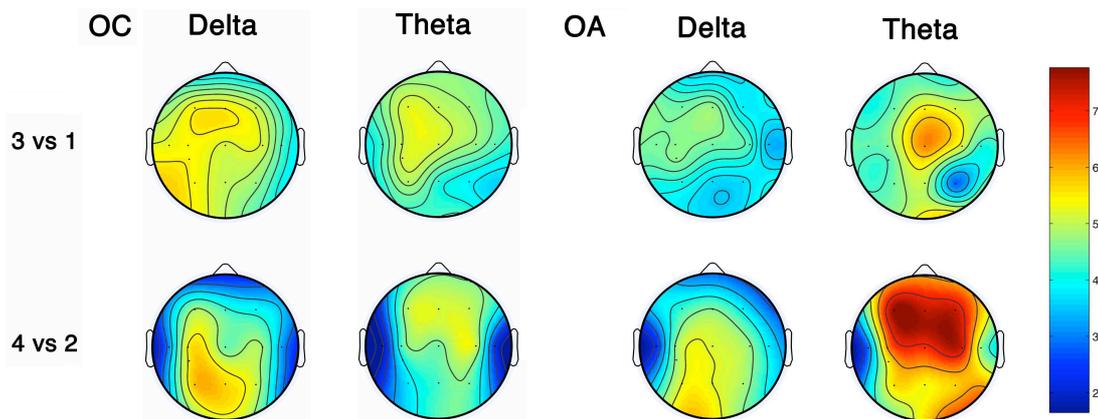


Figura 4. Distribuzioni topografiche dei confronti statistici (*t* di Student per campioni appaiati) che hanno confrontato le prove del mattino (3 vs. 1) e le prove serali (4 vs. 2) in relazione a ciascuna derivazione corticale nella condizione ad occhi chiusi (OC) e ad occhi aperti (OA) nelle bande di frequenza EEG delta e theta. I valori sono espressi in termini di *t*-values ($n=16$): *t*-values positivi indicano una prevalenza del delta o del theta post-DS sul pre-DS e viceversa. Il livello di significatività a due code dopo correzione tramite False Discovery Rate per la condizione OC corrisponde a $t \geq 2.38$ ($q \leq 0.0003$; $p \leq 0.03$), mentre per la condizione OA equivale a $t \geq 2.35$ ($q \leq 0.0003$; $p \leq 0.03$). Le mappe si basano su 20 derivazioni corticali (la posizione degli elettrodi è indicata dai punti).

3.3.5 Componenti precoci dei SEP

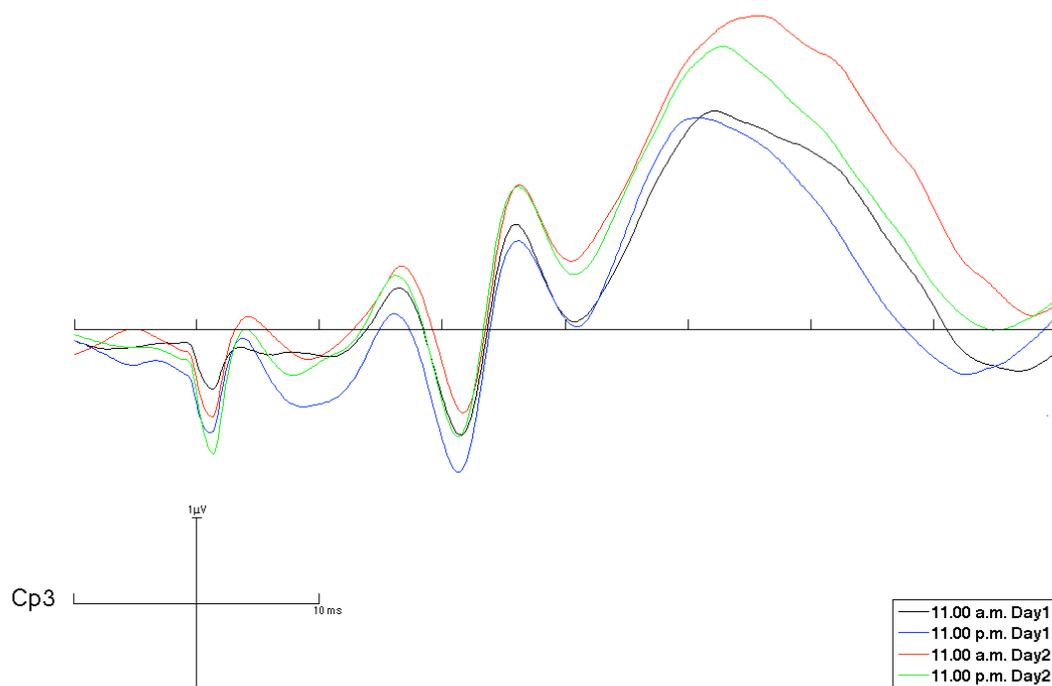


Figura 5. Grand average dei SEP pre-PAS in seguito a stimolazione del nervo mediano destro durante le 4 sessioni sperimentali in corrispondenza della derivazione Cp3.

La Figura 5 mostra il *grand average* dei SEP pre-PAS registrati in corrispondenza di Cp3 nel corso delle 4 sessioni sperimentali. Le ANOVA Giorno X Ora del Giorno effettuate su Cp3 indicano un significativo effetto del Giorno per le componenti P14 (Pre-SD=0.45 SE=±0.24 μ V; Post-SD=0.77 SE=±0.17 μ V; $F_{1,15}=4.94$; $p=0.04$), P25 (Pre-SD=1.39 SE=±0.44 μ V; Post-SD=1.98 SE=±0.46 μ V; $F_{1,15}=6.97$; $p=0.02$) e P40 (Pre-SD=3.24 SE=±0.54 μ V; Post-SD=4.26 SE=±0.56 μ V; $F_{1,15}=6.14$; $p=0.03$), nella direzione di un incremento dell'ampiezza di queste componenti in seguito a DS (Figura 6A). Lo stesso effetto è stato osservato in C3 (Fig. 6B) per le componenti P14 (Pre-SD=0.66 SE=±0.24 μ V; Post-SD=1.12 SE=±0.21 μ V; $F_{1,15}=6.88$; $p=0.02$), P25 (Pre-SD=1.72 SE=±0.43 μ V; Post-SD=2.32 SE=±0.53 μ V; $F_{1,15}=6.62$; $p=0.02$) e P40 (Pre-SD=2.57 SE=±0.55 μ V; Post-SD=4.10 SE=±0.70 μ V $F_{1,15}=13.48$; $p=0.002$), ed in P3 (Fig 6C) per le derivazioni P25 (Pre-SD=0.73 SE=±0.43 μ V; Post-SD=1.23 SE=±0.40 μ V $F_{1,15}=4.41$; $p=0.05$) N30 (Pre-SD=0.25 SE=±0.48 μ V; Post-SD=0.65 SE=±0.36 μ V $F_{1,15}=5.43$; $p=0.03$). Per nessuna di queste derivazioni corticali sono stati osservati effetti significativi dell'Ora del Giorno, né effetti di interazione.

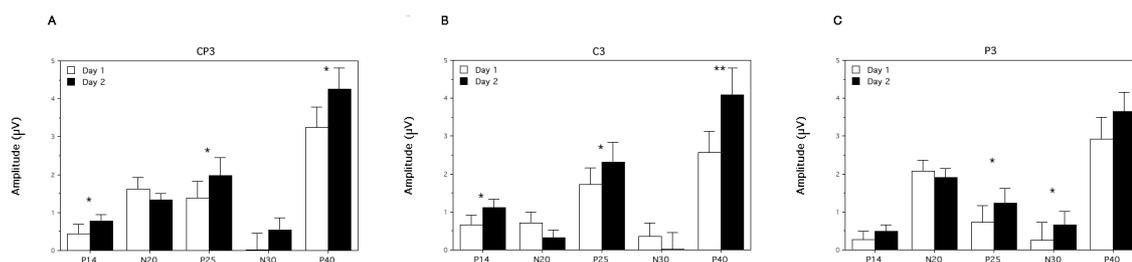


Figura 6. Ampiezza media (espressa in μ V) delle componenti P14, N20, P25, N30, P40 dei SEP pre-PAS durante il giorno precedente (barra bianca) e quello successivo (barra nera) alla DS (* $p<0.05$, ** $p<0.005$), nelle derivazioni corticali Cp3 (A), C3 (B) e P3 (C). Le barre di errore rappresentano gli errori standard.

3.3.6 Cambiamenti nella distribuzione dei voltaggi sullo scalpo in seguito a *deprivazione di sonno*

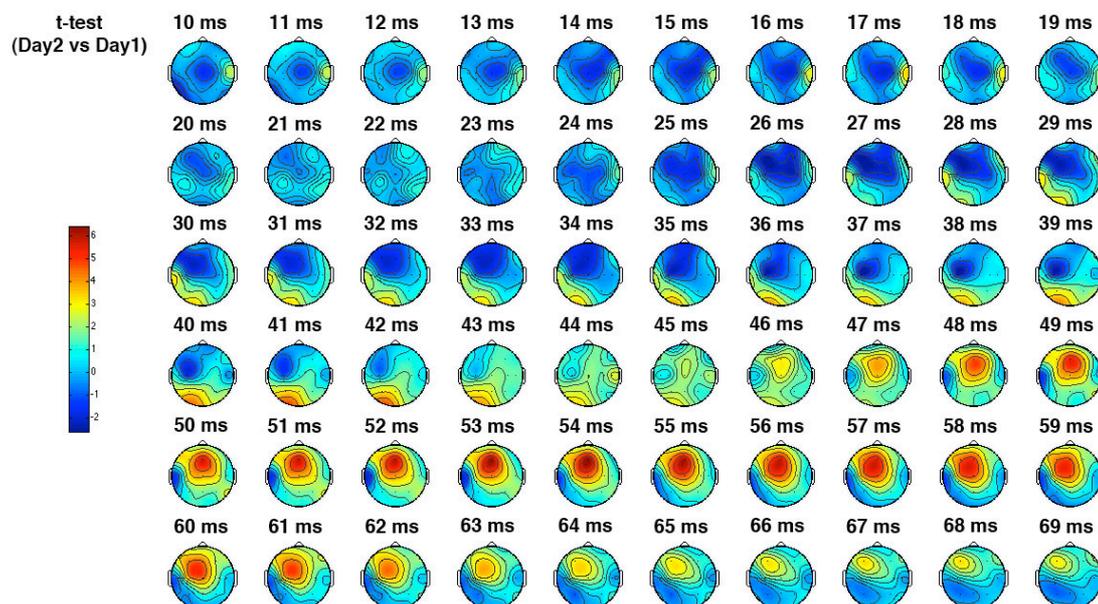


Figura 7. Mappe statistiche dei confronti tra voltaggi associati ai SEP pre- e post-DS nella finestra temporale 10-69 ms, divisi in bin temporali da 1 ms. I valori sono espressi in termini di t-values ($n=16$): t-values positivi indicano una prevalenza del voltaggio post-DS su quello pre-DS e viceversa. Il livello di significatività a due code dopo correzione tramite False Discovery Rate ($q \leq 0.05$; $p \leq 0.003$) corrisponde a $t \geq 3.58$. Le mappe si basano su 20 derivazioni corticali (la posizione degli elettrodi è indicata dai punti).

Data l'assenza di effetti significativi dell'Orario del Giorno o di interazioni Giorno X Orario del Giorno, per ciascun giorno abbiamo collassato i valori dei voltaggi associati ai SEP pre-PAS raccolti in differenti orari (11.00 e 23.00). Le successive analisi relative alla distribuzione dei voltaggi dei SEP sullo scalpo comparavano la media dei SEP pre-PAS registrati durante il primo giorno (pre-DS) con la media dei SEP pre-PAS registrati durante il secondo giorno (post-DS). La Fig. 7 illustra le mappe statistiche (t di Student) dei confronti tra voltaggi dei SEP pre- vs. post-DS nella finestra temporale 10-69 ms. Cambiamenti significativi ($q \leq 0.05$; $p \leq 0.003$ corrispondente a $t \geq 3.58$), in termini di incremento del voltaggio in seguito a DS, sono stati osservati in corrispondenza dell'area occipitale sinistra (O1 tra 35 e 43 ms) ed in aree fronto-centrali (C3 a 56-60 ms, Cz a 47-62 ms, F3 a 51-62 ms, F4 a 49 ms).

e Fz a 47-62 ms). Il massimo incremento di voltaggio è stato osservato in corrispondenza della derivazione Fz a 54 ms.

3.3.7 Correlazione tra modificazioni dell'eccitabilità corticale e sonnolenza soggettiva e comportamentale

Dal momento che sia i risultati delle misure soggettive e comportamentali di sonnolenza che la topografia dei voltaggi associati ai SEP erano influenzati dalla DS, e mostravano solo effetti marginali dell'Ora del Giorno e di interazione sulla VAS ed un effetto principale dell'Ora del Giorno sulla KSS ma con un basso *effect size*, abbiamo cercato di esaminare l'esistenza di una possibile relazione tra i cambiamenti post-DS nella topografia corticale dei SEP e quelli nelle misure comportamentali (PVT) e auto-riferite (KSS e VAS) di sonnolenza in seguito a DS. Per quanto riguarda la topografia dei SEP, abbiamo preso in considerazione il *bin* temporale che esibiva il maggior incremento del voltaggio in seguito a DS. Pertanto, abbiamo considerato la distribuzione corticale dei voltaggi a 54 ms come misura dell'influenza della DS sulla topografia dei SEP pre-PAS e sia per i voltaggi del Giorno 1 che per quelli del Giorno 2 veniva calcolata la media tra le registrazioni del mattino e quelle serali. Allo stesso modo, le misure medie per il Giorno 1 e per il Giorno 2 venivano calcolate per KSS, VAS e PVT. Per ogni derivazione corticale, venivano calcolati i coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman tra le modificazioni post-DS nel voltaggio dei SEP a 54 ms (Δ SEPs 54 ms) e, rispettivamente, i cambiamenti provocati dalla veglia prolungata nei punteggi alla KSS (Δ KSS), alla VAS (Δ VAS) e nella prestazione al PVT (Δ PVT). Il FDR è stato applicato come correzione per comparazioni multiple. La distribuzione topografica dei coefficienti di correlazione è illustrata in Fig. 8. Significative correlazioni positive ($q \leq 0.03$; $p \leq 0.05$ corrispondente a $\rho \geq 0.51$) sono state osservate tra Δ SEP a 54

ms e Δ KSS (Cp3, F3, P3, Pz), Δ VAS (C3, C4, Cp3, Cz, P3, P4, Pz, T3, T5) e Δ PVT (P3, T5). Le correlazioni più elevate sono state osservate in corrispondenza (ed in prossimità) dell'area S1.

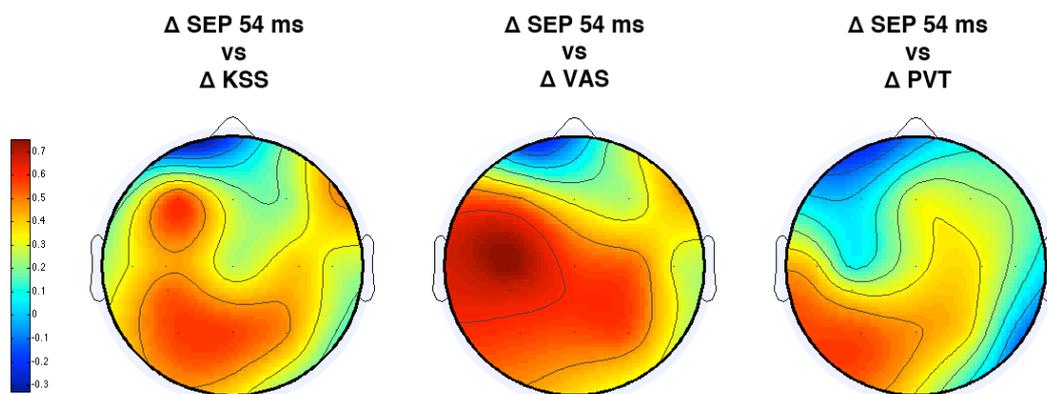


Figura 8. Distribuzione topografica dei coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman ($n=16$) tra modificazioni in seguito a DS nei voltaggi associati ai SEP a 54 ms (Δ SEPs 54 ms) comparate rispettivamente con i cambiamenti post-DS a KSS (Δ KSS), VAS (Δ VAS) e PVT (Δ PVT). I valori sono espressi in termini di rho: valori di rho positivi indicano la presenza di una correlazione positiva e viceversa. Le mappe sono basate su 20 derivazioni corticali (la posizione degli elettrodi è indicata dai punti). Il livello di significatività in seguito a correzione tramite False Discovery Rate ($q \leq 0.03$; $p \leq 0.05$) corrisponde a $\rho \geq 0.51$.

3.3.8 Effetti del protocollo PAS

Efficacia del protocollo LTP-like

Tutti i partecipanti allo studio erano stati reclutati perché mostravano, durante la sessione di reclutamento, un incremento dell'ampiezza del complesso N20-P25 maggiore del 5.4% in seguito al protocollo PAS. Nonostante ciò, durante la prima sessione sperimentale, alle 11.00 del primo giorno (pre-DS) il PAS non è stato in grado di indurre alcuna modificazione significativa nell'ampiezza del complesso

N20-P25 in Cp3, producendo solo un lieve incremento medio di circa il 2.1% (Fig. 9).

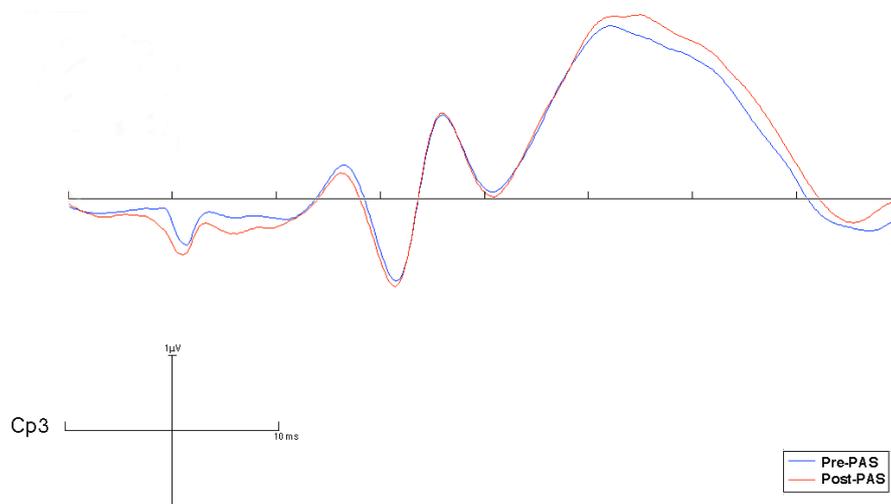


Figura 9. Grand average dei SEP pre- e post-PAS registrati in corrispondenza della derivazione Cp3 durante la prima sessione sperimentale. Il protocollo PAS ha prodotto sul un piccolo incremento del complesso N20-P25.

L'ampiezza del complesso N20-P25 non era significativamente influenzata dalla stimolazione associativa (Pre-PAS=2.86 SE=±0.36 µV; Post-PAS=3.00 SE=±0.43 µV; $F_{1,15}=0.78$; $p=0.39$). Tale assenza di cambiamenti significativi era osservabile anche nelle derivazioni adiacenti C3 (Pre-PAS=2.36 SE=±0.37 µV; Post-PAS=2.44 SE=±0.38 µV; $F_{1,15}=0.62$; $p=0.44$) e P3 (Pre-PAS=2.69 SE=±0.37 µV; Post-PAS=2.75 SE=±0.44 µV; $F_{1,15}=0.18$; $p=0.68$). Dai risultati emerge una notevole variabilità interindividuale, dato che solo 9 dei 16 soggetti mostrano l'atteso incremento del complesso N20-P25 durante la prima sessione sperimentale (Fig. 10).

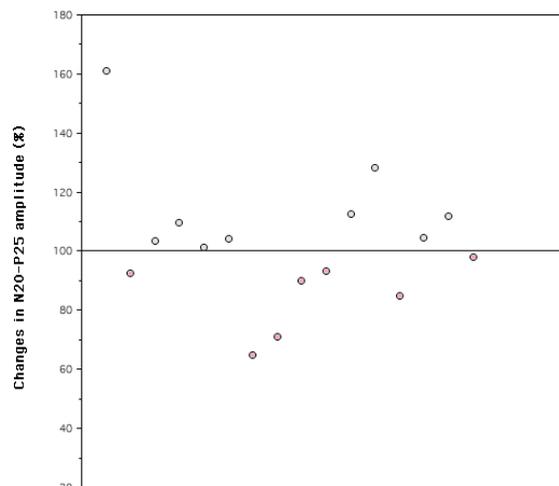


Figura 10. Effetti indotti dal PAS sul complesso N20-P25 dei SEP dei singoli soggetti, espressi in termini di ratio tra SEP pre- e post-PAS registrati durante la prima sessione sperimentale sulla derivazione Cp3. Il 100% corrisponde all'ampiezza del complesso N20-P25 pre-PAS. Solo 9 dei 16 soggetti mostrano un incremento dell'ampiezza del complesso N20-P25.

Cambiamenti pre- vs. post-PAS in funzione della deprivazione di sonno

Tabella 1. Effetti principali ed interazioni delle ANOVA *Giorno (G) X Ora dei Giorno (O)* sulle variazioni d'ampiezza (ratio) pre- vs post-PAS del complesso N20-P25 e delle singole componenti N20 e P25 nelle derivazioni corticali Cp3, C3 e P3.

	F _(1,15)			P		
	Cp3	C3	P3	Cp3	C3	P3
N20-P25 G	0.02	0.0001	0.26	0.88	0.99	0.62
N20-P25 O	0.50	1.12	0.10	0.49	0.31	0.76
N20-P25 GxO	0.02	0.36	0.42	0.89	0.56	0.53
N20 G	1.38	0.11	0.82	0.26	0.75	0.38
N20 O	1.38	2.76	1.21	0.26	0.12	0.29
N20 GxO	0.56	0.01	1.28	0.46	0.91	0.28
P25 G	2.04	2.42	0.04	0.17	0.14	0.85
P25 O	1.18	0.41	0.06	0.30	0.53	0.81
P25 GxO	1.89	0.11	0.02	0.19	0.74	0.88

Indipendentemente dall'assenza di effetti significativi del PAS nel corso della prima sessione sperimentale, abbiamo cercato di verificare se tale misura fosse in qualche modo influenzata dalla DS. La Tabella 1 riporta gli effetti principali e le interazioni dell'ANOVA effettuata con lo scopo di valutare gli effetti del PAS nel corso della DS. L'ampiezza del complesso N20-P25 registrato in corrispondenza di Cp3 non mostrava alcun effetto significativo o interazione. Nessun effetto

significativo, inoltre, è stato osservato per le singole componenti N20 e P25. La stessa assenza di effetti significativi è stata confermata anche per le derivazioni C3 e P3.

3.4 Discussione

3.4.1 Modificazioni dell'EEG di veglia

Come atteso, la DS di sonno ha provocato un generalizzato incremento delle bande di frequenza EEG *delta* e *theta* sia nella condizione ad OC che ad OA. Il *theta* incrementava maggiormente in corrispondenza delle aree centro-frontali, a conferma di quanto rilevato nei precedenti studi relativi alla topografia EEG corticale in seguito a perdita di sonno (Finelli *et al.*, 2000; Tinguely *et al.*, 2006, De Gennaro *et al.*, 2007). Al contrario, il *delta* mostra un incremento più omogeneo al mattino ed una prevalenza in regioni posteriori la sera. Seppur con diversa topografia, comunque, le bande *delta* e *theta* si confermano i principali *marker* elettroencefalografici dell'accumulo di sonnolenza in veglia.

3.4.2 Variazioni d'ampiezza delle componenti precoci dei SEP

L'ampiezza di differenti componenti dei SEP incrementava in seguito a DS, indicando un aumento dell'eccitabilità corticale, come previsto dall'ipotesi. Un incremento d'ampiezza post-DS della P14 è stato osservato in corrispondenza delle derivazioni Cp3 e C3. Studi precedenti indicano che la P14 ha origine sotto-corticale, probabilmente nel tratto troncoencefalico del sistema lemniscale (Desmedt e Cheron, 1980; 1981; Yamada *et al.*, 1986; Rossini *et al.*, 1987; Sonoo *et al.*, 1997; Lee e Seyal, 1998) che proietta al talamo. L'ampiezza della P25 incrementava in tutte le derivazioni prese in considerazione (Cp3, C3 e P3); ciò potrebbe riflettere uno specifico effetto della DS sull'area S1, dato che questa componente viene generata

nel banco posteriore del solco centrale (Allison *et al.* 1989, 1991; Rossini *et al.*, 1987; Urbano *et al.* 1997; Lee e Seyal, 1998; Manguiere *et al.* 1999; Balzamo *et al.* 2004). La componente N30 mostra un incremento d'ampiezza solo nella derivazione P3. Tale componente parietale negativa intorno a 30 ms sembra coinvolgere generatori nell'area 1 superficiale (Jones *et al.*, 1978). Un aumento dell'ampiezza della componente P40 dopo DS è stata osservata in Cp3 e C3. In particolare, in corrispondenza della derivazione C3 questa componente raggiunge il massimo incremento d'ampiezza osservato nel presente studio. Il principale generatore della P40 si troverebbe nel giro postcentrale, in corrispondenza dell'area 1 di Brodmann (Allison *et al.*, 1991). La DS, quindi, sembra influenzare il processamento dell'informazione somatosensoriale a differenti livelli: a) un livello sottocorticale, quando l'informazione sensoriale viaggia dal tronco encefalico al talamo; b) un livello corticale, quando l'informazione sensoriale viene processata in S1. Questi risultati sono parzialmente coerenti con quelli dell'unico studio precedente ad aver valutato gli effetti della perdita di sonno sulle componenti precoci dei SEP (Terney *et al.*, 2005) che mostrava, dopo 24 ore di veglia prolungata, un incremento dell'ampiezza del complesso N20-P24 parietale, probabilmente dovuto al potenziamento della componente P24, e del complesso P45-N60. Inoltre, in diversi studi è stato osservato un decremento dell'ampiezza delle componenti dei SEP registrate in corrispondenza dell'area parietale durante il sonno, mentre le componenti frontali mostravano un incremento dell'ampiezza (Noguchi *et al.*, 1995) o nessun cambiamento significativo (Nakano *et al.*, 1995), suggerendo che durante il sonno siano attivi sia processi eccitatori che inibitori. E' possibile che il sonno sia necessario per riequilibrare i cambiamenti nella responsività corticale indotti durante la veglia, mentre la perdita di sonno potrebbe provocare un incremento dell'eccitabilità corticale in quelle aree che necessitano di un processo inibitorio

sonno-dipendente. Studi precedenti mostravano un'elevata responsività in molte regioni corticali dopo veglia prolungata, valutata tramite differenti metodi quali MEP (Badawy *et al.*, 2006; Kreuzer *et al.*, 2011; Scalise *et al.*, 2006), TEP (Del Felice *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2012) e potenziali evento-correlati durante un compito uditivo (Bortoletto *et al.*, 2011). I nostri risultati, in accordo con quanto previsto dall'Ipotesi di Omeostasi Sinaptica, confermano l'esistenza di un fenomeno di incremento della responsività corticale dopo DS ed estendono tale osservazione alla corteccia somatosensoriale.

L'ora del giorno in cui i SEP venivano registrati (11:00 o 23:00) non sembrava avere un'influenza sull'ampiezza delle componenti dei SEP, suggerendo che l'eccitabilità della corteccia somatosensoriale non sia condizionata da fattori circadiani. Registrare i SEP, quindi, può essere considerato un buon metodo per valutare longitudinalmente l'eccitabilità corticale in S1. Una simile assenza di effetti dell'ora del giorno sulla responsività corticale è stata osservata anche in corteccia motoria primaria umana (Doeltgen e Ridding, 2010) e nella corteccia frontale e parietale nei ratti (Vyazovskiy *et al.*, 2012).

3.4.3 Cambiamenti nella distribuzione topografica dei voltaggi associati ai SEP

La DS induceva cambiamenti significativi nella distribuzione dei voltaggi associati ai SEP in seguito a stimolazione del nervo mediano. In particolare, un significativo incremento del voltaggio è stato osservato nell'area occipitale sinistra a 35-43 ms e nelle aree fronto-centrali a 47-62 ms, indicando un aumento della responsività corticale in queste regioni corticali. Il massimo incremento del voltaggio è stato osservato in corrispondenza della derivazione Fz a 54 ms. È interessante notare che sia l'incremento occipitale che quello fronto-centrale del voltaggio sono stati osservati nella finestra temporale usata per la detezione della componente P40.

Ciò è coerente con il massimo incremento d'ampiezza delle componenti dei SEP, osservato per la P40 in corrispondenza della derivazione C3. L'elevata responsività corticale in aree anteriori non è sorprendente, dato che queste regioni corticali sono le più vulnerabili agli effetti negativi della perdita di sonno (Horne *et al.*, 1993; Drummond *et al.*, 2000). L'incremento delle bande di frequenza EEG lente dopo DS in aree fronto-centrali è ormai un'evidenza ben consolidata (Cajochen *et al.*, 2002; De Gennaro *et al.*, 2007; Finelli *et al.*, 2000; Tinguely *et al.*, 2006) ed ha trovato conferma anche nei risultati EEG del presente lavoro. L'incremento della responsività corticale potrebbe rappresentare un ulteriore correlato neuropsicologico della vulnerabilità delle aree fronto-centrali alla perdita di sonno. L'elevato voltaggio a livello occipitale dopo DS è, invece, un dato inatteso, più difficile da spiegare. Un significativo incremento dell'attività *theta* occipitale (sebbene secondario alla predominanza frontale) è stato osservato nell'EEG di veglia dopo 40 ore di DS (De Gennaro *et al.*, 2007) e nel corso della notte di sonno di recupero in seguito a 36 ore di veglia prolungata (Finelli *et al.*, 2001), indicando che questa regione corticale (secondariamente alle aree anteriori) può essere suscettibile di effetti riconducibili alla perdita di sonno. Saranno necessari ulteriori studi per chiarire la possibile relazione tra questi fenomeni.

Un dato interessante, sebbene al di là degli obiettivi del presente studio, è rappresentato dalla correlazione positiva osservata tra i cambiamenti di eccitabilità corticale e l'atteso incremento della sonnolenza con l'aumentare delle ore di veglia, valutato tramite misure soggettive (KSS e VAS) e comportamentali (PVT). Gli elettrodi posizionati in corrispondenza (ed in prossimità) dell'area S1 mostravano le correlazioni positive più elevate. Tale risultato fornisce ulteriore supporto ai nostri risultati, mostrando un collegamento sito-specifico tra eccitabilità corticale e classiche misure di sonnolenza. Inoltre, il presente dato apre nuove prospettive per

l'interpretazione del substrato neurofisiologico della sonnolenza, suggerendo che l'incremento dell'eccitabilità corticale potrebbe essere uno dei meccanismi sottostanti il peggioramento delle prestazioni cognitive e la riduzione della vigilanza osservate in seguito a veglia prolungata.

3.4.4 Plasticità corticale dopo deprivazione di sonno

Nel presente lavoro, il protocollo PAS è stato utilizzato con l'intento di indurre modificazioni di tipo LTP-like in corteccia somatosensoriale, per valutare se la DS fosse in grado di influenzare tali effetti plastici. Dai risultati, però, emerge che già in corrispondenza della prima sessione sperimentale (quindi in assenza di DS) non erano osservabili modificazioni significative dell'ampiezza dei SEP in seguito all'utilizzo del protocollo PAS. Tale assenza di variazioni significative può essere spiegata in termini di grande variabilità interindividuale, un problema già osservato in altri esperimenti che utilizzavano il PAS per la valutazione di variazioni plastiche (Pellicciari *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2008). Inoltre, nel presente lavoro è stata osservata anche una notevole variabilità intraindividuale, dato che soggetti che durante la sessione di pre-selezione mostravano un incremento post-PAS medio dell'ampiezza del complesso N20-P25 di circa il 27.4%, durante la prima sessione sperimentale mostravano un incremento medio di solo il 2.1%. L'assenza di attendibilità intraindividuale del protocollo PAS è stata precedentemente osservata da Fratello *et al.* (2006). Tutti gli studi che hanno riportato una elevata variabilità intra- ed interindividuale degli effetti provocati dal PAS avevano come obiettivo quello di caratterizzare cambiamenti plastici in corteccia motoria. I presenti risultati estendono tale osservazione alla corteccia somatosensoriale.

Il protocollo PAS non ha indotto alcuna modificazione significativa nelle componenti precoci dei SEP neanche nelle successive sessioni sperimentali (23:00

pre-DS; 11:00 post-DS; 23:00 post-DS). Tale assenza di risultati significativi è imputabile all'elevata variabilità intra- ed interindividuale mostrata dal protocollo PAS. Questi risultati suggeriscono di essere cauti, in futuro, nella valutazione longitudinale degli effetti del protocollo PAS sulla plasticità corticale somatosensoriale.

Stante l'assenza dell'atteso effetto LTP-like PAS-dipendente durante la prima sessione sperimentale, risulta difficile interpretare i dati relativi alle sessioni successive. L'influenza della DS sui meccanismi di plasticità corticale e la possibile relazione tra tali meccanismi e l'osservato incremento dell'eccitabilità corticale, pertanto, rimangono una questione aperta. Altri meccanismi neuropsicologici, comunque, potrebbero essere alla base dell'aumentata responsività corticale. Il decremento della SICI dei MEP in seguito a DS di sonno osservato in diversi studi (Civardi *et al.*, 2001; Scalise *et al.*, 2006; Kreuzer *et al.*, 2011) potrebbe rappresentare l'effetto della DS sul sistema neurotrasmettitoriale che controlla il bilanciamento di inibizione/eccitazione nei circuiti corticali. Inoltre, l'eccitabilità corticale potrebbe aumentare in funzione dell'elevata iperpolarizzazione dei neuroni corticali (Hill e Tononi, 2005).

CONCLUSIONI

Il presente studio aveva come obiettivo quello di valutare gli effetti di una notte di DS su una misura di sonnolenza espressa a livello elettroencefalografico e su misure di eccitabilità corticale e plasticità LTP-like. I risultati mostrano come a livello elettroencefalografico la sonnolenza si esprima in termini di generalizzato incremento delle bande di frequenza lente, prevalentemente nelle aree fronto-centrali per quanto riguarda la banda *theta* e in aree centro-posteriori relativamente alla banda *delta*. L'eccitabilità corticale in corteccia somatosensoriale sembra aumentare

in seguito a DS, senza alcuna influenza di variazioni di tipo circadiano. Inoltre, la veglia prolungata sembra provocare delle modificazioni nella topografia corticale dei voltaggi associati ai SEP, in termini di incremento del voltaggio in aree fronto-centrali e nell'area occipitale sinistra. Insieme, questi dati sembrano essere in accordo con gli assunti dell'Ipotesi di Omeostasi Sinaptica, suggerendo che il sonno abbia un ruolo centrale nel mantenere l'eccitabilità corticale al di sotto di un livello potenzialmente pericoloso per il cervello umano, riequilibrando i cambiamenti di responsività corticale avvenuti durante la veglia. Ulteriore supporto a questa ipotesi deriva dalla correlazione positiva osservata tra variazioni di eccitabilità corticale e variazioni di sonnolenza espressa a livello soggettivo e comportamentale. Tale dato suggerisce che un alto livello di eccitabilità corticale potrebbe essere uno dei meccanismi alla base delle alterazioni della vigilanza e del comportamento umano in seguito a DS. Infine, il protocollo PAS, usato per valutare le variazioni di plasticità corticale nel corso della DS, si è dimostrato fortemente influenzato da un'elevata variabilità intra- ed interindividuale, dato che raccomanda cautela nei futuri utilizzi di questo strumento, quantomeno in corteccia somatosensoriale. Ulteriori studi saranno quindi necessari per comprendere in che modo, nell'umano, variano i meccanismi di plasticità corticale in condizione di veglia prolungata ed in che relazione siano con i cambiamenti osservati nelle misure di eccitabilità corticale e di sonnolenza.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Abbruzzese, G., Marchese, R., Buccolieri, A., Gasparetto, B., Trompetto, C., 2001. Abnormalities of sensorimotor integration in focal dystonia: a transcranial magnetic stimulation study. *Brain* 124, 537-545.
- Achermann, P., Finelli, L.A., Borbely, A.A., 2001. Unihemispheric enhancement of delta power in human frontal sleep EEG by prolonged wakefulness. *Brain Res.* 913, 220-223.
- Aeschbach, D., Matthews, J.R., Postolache, T.T., Jackson, M.A., Giesen, H.A., Wehr, T.A., 1997. Dynamics of the human EEG during prolonged wakefulness: evidence for frequency-specific circadian and homeostatic influences. *Neurosci. Lett.* 239, 121-124.
- Ahissar, E., Sosnik, R., Bagdasarian, K., Haidarliu, S., 2001. Temporal frequency of whisker movement. II. Laminar organization of cortical representations. *J. Neurophysiol.* 86, 354-367.
- Akerstedt, T., Gillberg, M., 1990. Subjective and objective sleepiness in the active individual. *Int. J. Neurosci.* 52, 29-37.
- Allen, C.B., Celikel, T., Feldman, D.E., 2003. Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 291-299.
- Allison, T., McCarthy, G., Wood, C.C., Jones, S.J., 1991. Potentials evoked in human and monkey cerebral cortex by stimulation of the median nerve. A review of scalp and intracranial recordings. *Brain* 114, 2465-2503.
- Allison, T., McCarthy, G., Wood, C.C., Williamson, P.D., Spencer, D.D., 1989. Human cortical potentials evoked by stimulation of the median nerve. II. Cytoarchitectonic areas generating long-latency activity. *J. Neurophysiol.* 62, 711-722.
- Amassian, V.E., Stewart, M., Quirk, G.J., Rosenthal, J.L., 1987. Physiological basis of motor effects of a transient stimulus to cerebral cortex. *Neurosurgery* 20, 74-93.
- Andersen, P., Lomo, T., 1967. Control of hippocampal output by afferent volley frequency. *Prog. Brain Res.* 27, 400-412.
- Andersen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P. E., 1966. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.* 66, 448-460.
- Armstrong-James, M., Fox, K., Das-Gupta, A., 1992. Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J. Neurophysiol.* 68, 1345-1358.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Keller, A., 1995. LTP in the barrel cortex of adult rats. *Neuroreport* 6, 2297-2300.
- Artola, A., Brocher, S., Singer, W., 1990. Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347, 69-72.
- Aston-Jones, G., Bloom, F., 1981. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1, 876-886.
- Ayalon, L., Ancoli-Israel, S., Klemfuss, Z., Shalauta, M.D., Drummond, S.P., 2006. Increased brain activation during verbal learning in obstructive sleep apnea. *NeuroImage* 31, 1817-1825.
- Badawy, R.A., Curatolo, J.M., Newton, M., Berkovic, S.F., Macdonell, R.A., 2006. Sleep deprivation increases cortical excitability in epilepsy: syndrome-specific effects. *Neurology* Sep. 26; 67(6), 1018-1022.
- Bagnato, S., Agostino, R., Modugno, N., Quartarone, A., Berardelli, A., 2006. Plasticity of the motor cortex in Parkinson's disease patients on and off therapy. *Mov. Disord.* 21, 639-645.
- Balzamo, E., Marquis, P., Chauvel, P., Regis, J., 2004. Short-latency components of evoked potentials to median nerve stimulation recorded by intracerebral electrodes in the human pre- and postcentral areas. *Clin. Neurophysiol.* 115, 1616-1623.
- Bara-Jimenez, W., Catalan, M.J., Hallett, M., Gerloff, C., 1998. Abnormal somatosensory homunculus in dystonia of the hand. *Ann. Neurol.* 44, 828-831.
- Barker, A.T., Jalinous, R., Freeston, I.L., 1985. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106-1110.
- Barth, A.L., 2002. Differential plasticity in neocortical networks. *Physiol. Behav.* 77, 545-550.
- Bear, M.F., Kirkwood, A., 1996. Bidirectional plasticity of cortical synapses. In: *Cortical plasticity* (Frazeli MS, Collingridge GL, eds), 191-205. Oxford: BIOS Scientific.
- Bergmann, T.O., Molle, M., Marshall, L., Kaya-Yildiz, L., Born J., Siebner, H.R., 2008. A local signature of LTP- and LTD-like plasticity in human NREM sleep. *Euro. Jour. Neurosci.* 27, 2241-2249.
- Bettendorff, L., Sallanon-Moulin, M., Touret, M., Wins, P., Margineanu, I., Schoffeniels, E., 1996. Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex. *Sleep* 19, 65-71.
- Bjoertomt, O., Cowey, A., Walsh, V., 2002. Spatial neglect in near and far space investigated by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Brain* 125, 2012-2022.
- Bienenstock, E.L., Cooper, L.N., Munro, P.W., 1982. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J. Neurosci.* 2, 32-48.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

- Bliss, T., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356.
- Borbely, A.A., 1982. A two process model of sleep regulation. *Hum. Neurobiol.* 1, 195–204.
- Borbely, A.A., 2001. From slow waves to sleep homeostasis: new perspectives. *Arch. Ital. Biol.* 139, 53–61.
- Borbely, A.A., Achermann, P., 1999. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J. Biol. Rhythms* 14(6), 557–568.
- Brambilla, P., Perez, J., Monchieri, S., Rossini, P.M., Bonato, C., 2003. Transient improvement of tardive dyskinesia induced with rTMS. *Neurology* 61, 1155.
- Brasil-Neto, J.P., Cohen, L.G., Pascual-Leone, A., Jabir, F.K., Wall, R.T., Hallett, M., 1992-. Rapid reversible modulation of human motor outputs after transient deafferentation of the forearm: a study with transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 42, 1302–1306.
- Braun, A.R., Balkin, T.J., Wesenten, N.J., Carson, R.E., Varga, M., Baldwin, P., et al., 1997. Regional cerebral blood flow throughout the sleep–wake cycle. An H2(15)O PET study. *Brain* 120(Pt 7), 1173–1197.
- Brighina, F., Bisiach, E., Oliveri, M., Piazza, A., La Bua, V., Daniele, O., Fierro, B., 2003. 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere ameliorates contralesional visuospatial neglect in humans. *Neurosci. Lett.* 336, 131–133.
- Borbely, A.A., Achermann, P., 1999. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J. Biol. Rhythms* 14(6), 557–568.
- Borbely, A.A., Achermann, P., 2000. Sleep homeostasis and models of sleep regulation, in: M.H. Kryger, T. Roth, W.C. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine*, Raven Press, New York, 377–390.
- Born, J., Rasch, B., Gais, S., 2006. Sleep to remember. *Neuroscientist* 12, 410–424.
- Boroojerdi, B., Prager, A., Muellbacher, W., Cohen, L.G., 2000. Reduction of human visual cortex excitability using 1 Hz transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 54, 1529–1531.
- Bower, J.M., Haberly, L.B., 1986. Facilitating and nonfacilitating synapses on pyramidal cells: a correlation between physiology and morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1115–1119.
- Brunner, D.P., Dijk, D.J., Borbely, A.A., 1993. Repeated partial sleep deprivation progressively changes in EEG during sleep and wakefulness. *Sleep* 16, 100–113.
- Bushey, D., Tononi, G., Cirelli, C., 2011. Sleep and Synaptic homeostasis: structural evidence in drosophila. *Science* 332, 1576-1581.
- Butefisch, C.M., Khurana, V., Kopylev, L., Cohen, L.G., 2004. Enhancing encoding of a motor memory in the primary motor cortex by cortical stimulation. *J. Neurophysiol.* 91, 2110–2116.
- Butefisch, C.M., Davis, B.C., Wise, S.P., Sawaki, L., Kopylev, L., Classen, J., Cohen, L.G., 2000. Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3661—3665.
- Cajochen, C., Brunner, D.P., Krauchi, K., Graw, P., Wirz-Justice, A., 1995. Power density in theta/alpha frequencies of the waking EEG progressively increases during sustained wakefulness. *Sleep* 18, 890–894.
- Castro-Alamancos, M.A., Connors, B.W., 1996. Short-term synaptic enhancement and long-term potentiation in neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 1335–1339.
- Castro-Alamancos, M.A., Donoghue, J.P., Connors, B.W., 1995. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J. Neurosci.* 15, 5324–5333.
- Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., et al., 2001. Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1071–1077.
- Cherubini, E., Herrling, P.L., Lanfume, L., Stanzione, P., 1988. Excitatory aminoacids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol.* 400, 677-690.
- Chee, M.W., Tan, J.C., Zheng, H., Parimal, S., Weissman, D.H., Zagorodnov, V., Ding, D.F., 2008. Lapsing during sleep deprivation is associated with distributed changes in brain activation. *Jour. Neurosci.* 28(21), 5519-5528.
- Chklovskii, D.B., Schikorski, T., Stevens, C.F., 2002. Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron* 34(3), 341–347.
- Christina, S., Thanh, D., Pierre, O., Fabien, P., Gilles, V., Derk Jan, D., Fabienne, C., Philippe, P., 2006. Time-of-day modulations of regional cerebral blood flow response in functional brain imaging studies: a metaanalysis. *Sleep* 29, A58.
- Cirelli, C., Gutierrez, C.M., Tononi, G., 2004. Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* 41(1), 35–43.
- Cirelli, C., Pompeiano, M., Tononi, G., 1996. Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus coeruleus, *Science* 274 1211–1215.
- Cirelli, C., Tononi, G., 2000a. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J. Neurosci.* 20(24), 9187–9194.
- Cirelli, C., Tononi, G., 2000b. Gene expression in the brain across the sleep–waking cycle. *Brain Res.* 885(2), 303–321.

- Civardi, C., Boccagni, C., Vicentini, R., Bolamperti, L., Tarletti, R., Varrasi, C., Monaco, F., Cantello, R., 2001. Cortical excitability and sleep deprivation: a transcranial magnetic stimulation study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 71, 809–812.
- Clark, S.A., Allard, T., Jenkins, W.M., Merzenich, M.M., 1988. Receptive fields in the body-surface map in adult cortex defined by temporally correlated inputs. *Nature* 332, 444–445.
- Classen, J., Liepert, J., Wise, S.P., Hallett, M., Cohen, L.G., 1998. Rapid plasticity of human cortical movement representation induced by practice. *J. Neurophysiol.* 79, 1117–1123.
- Cohen, L.G., Bandinelli, S., Findlay, T.W., Hallett, M., 1991a. Motor reorganisation after upper limb amputation in man. *Brain* 114, 615–627.
- Cohen, L.G., Bandinelli, S., Sato, S., Kufta, C., Hallett, M., 1991b. Attenuation in detection of somatosensory stimuli by transcranial magnetic stimulation. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 81, 366–376.
- Cluydts, R., De Valck, E., Verstraeten, E., Theys, P., 2002. Daytime sleepiness and its evaluation. *Sleep Med. Rev.* 6, 83–96.
- Cothros, N., Kohler, S., Dickie, E.W., Mirsattari, S.M., Gribble, P.L., 2006. Proactive interference as a result of persisting neural representations of previously learned motor skills in primary motor cortex. *J. Cogn. Neurosci.* 18, 2167–2176.
- Curcio, G., Casagrande, M., Bertini, M., 2001. Sleepiness: evaluating and quantifying methods. *Int. J. Psychophysiol.* 41, 251–263.
- Curio, G., Mackert, B.M., Burghoff, M., Koetitz, R., Abraham-Fuchs, K., Harer, W., 1994. Localization of evoked neuromagnetic 600 Hz activity in the cerebral somatosensory system. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 91, 483–487.
- Damasio, A.R., 1997. Towards a neuropathology of emotion and mood. *Nature* 386, 769–770.
- Dan, Y., Poo, M.M., 2004. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron* 44, 23–30.
- De Gennaro, L., Bertini, M., Ferrara, M., Curcio, G., Cristiani, R., Romei, V., Fratello, F., Pauri, F., Rossini, P.M., 2004a. Intracortical inhibition and facilitation during sleep: a transcranial magnetic stimulation study. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3099–3104.
- De Gennaro, L., Bertini, M., Pauri, F., Cristiani, R., Curcio, G., Ferrara, M., Rossini, P.M., 2004b. Callosal effects of transcranial magnetic stimulation (TMS): The influence of gender and stimulus parameter. *Neurosci. Res.* 48, 129–137.
- De Gennaro, L., Fratello, F., Marzano, C., Moroni, F., Curcio, G., Tempesta, D., Pellicciari, M.C., Pirulli, C., Ferrara, M., Rossini, P.M., 2008. Cortical plasticity induced by transcranial magnetic stimulation during wakefulness affects electroencephalogram activity during sleep. *Plos One* 3, e2483.
- De Gennaro, L., Marzano, C., Veniero, D., Moroni, F., Fratello, F., Curcio, G., Ferrara, M., Ferlazzo, F., Novelli, L., Pellicciari, M.C., Bertini, M., Rossini, P.M., 2007. Neurophysiological correlates of sleepiness: a combined TMS and EEG study. *Neuroimage* 33, 1277–1287.
- Del Felice, A., Fiaschi, A., Bongiovanni, G.L., Savazzi, S., Manganotti, P., 2011. The sleep-deprived brain in normals and patients with juvenile myoclonic epilepsy: a perturbational approach to measuring cortical reactivity. *Epilepsy Res.* 96(1-2), 123–131.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trend. Neurosci.* 13, 281–285.
- De Manacéine, M., 1894. Quelques observation expérimentales sur l'influence de l'insomnie absolue. *Arch. Ital. Biol.* 21, 322–325.
- Desai, N.S., Cudmore, R.H., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G., 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 5(8), 783–789.
- Desmedt, J.E., Cheron, G., 1980. Central somatosensory conduction in man: neural generators and interpeak latencies of far field components recorded from neck and right or left scalp and earlobes. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 50, 382–403.
- Desmedt, J.E., Cheron, G., 1981. Prevertebral (oesophageal) recording of subcortical somatosensory evoked potentials in man: the spinal P13 component and the dual nature of the spinal generators. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 52, 257–275.
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., Hof, P.R. 2007. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell.* 6, 275–284.
- Dijk, D.J., Beersma, D.G., Daan, S., Bloem, G.M., Van den Hoofdakker, R.H., 1987. Quantitative analysis of the effects of slow wave sleep deprivation during the first 3 h of sleep on subsequent EEG power density. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* 236(6), 323–328.
- Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M., Mazzone, P., Insola, A., Tonali, P.A., Rothwell, J.C., 2004. The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans. *Clin. Neurophysiol.* 115, 255–266.
- Dinges, D.F., Kribbs, N.B., 1991. Performing while sleepy: effects of experimentally-induced sleepiness. In: Monk, T.H. (Ed.), *Sleep, Sleepiness and Performance*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 97–128.
- Dinges, D.F., Kribbs, N.B., 1994. Performing while sleepy: effects of experimentally induced sleepiness. In: T.H. Monk (Ed.) *Sleep, sleepiness and performance*. John Wiley, Winchester: 97–128.
- Dinner, D.S., 2002. Effect of sleep on epilepsy. *J. Clin Neurophysiol.* 19, 504–513.

- Donlea, J.M., Ramanan, N., Shaw, P.J., 2009. Use-dependent plasticità in clock neurons regulates sleep in *Drosophila*. *Science* 324, 105-108.
- Donlea, J.M., Thimgan, M.S., Suzuki, Y., Gottschalk, L., Shaw, P.J., 2011. Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in *Drosophila*. *Science* 332, 1571-1576.
- Donoghue, J.P., Hess, G., Sanes, J.N., 1996. Substrates and mechanisms for learning in motor cortex. In: *Acquisition of motor behavior in vertebrates* (Bloedel J, Ebner T, Wise SP, eds), 363-386. Cambridge, MA: MIT.
- Donoghue, J.P., Suner, S., Sanes, J.N. 1990. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp. Brain Res.* 79, 492-503.
- Drummond, S.P., Brown, G.G., Gillin, J.C., Stricker, J.L., Wong, E.C., Buxton, R.B., 2000. Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature* 403, 655-657.
- Drummond, S.P., Meloy, M.J., Yanagi, M.A., Orff, H.J., Brown, G.G., 2005. Compensatory recruitment after sleep deprivation and the relationship with performance. *Psychiat. Res. Neuroimaging.* 140, 211-223.
- Eccles, J.C., 1955. The central action of antidromic impulses in motor nerve fibres. *Pfluegers* 260, 385-415.
- Elbert, T., Candia, V., Altenmuller, E., Rau, H., Sterr, A., Rockstroh, B., Pantev, C., Taub, E., 1998. Alteration of digital representations in somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Neuroreport* 9, 3571-3575.
- Elbert, T., Pantev, C., Wienbruch, C., Rockstroh, B., Taub, E., 1995. Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* 270, 305-307.
- Enomoto, H., Ugawa, Y., Hanajima, R., Yuasa, K., Mochizuki, H., Terao, Y., Shii, Y., Furubayashi, T., Iwata, N.K., Kanazawa, I., 2001. Decreased sensory cortical excitability after 1 Hz rTMS over the ipsilateral primary motor cortex. *Clin. Neurophysiol.* 112, 2154-2158.
- Eyre, M.D., Richter-Levin, G., Avital, A., Stewart, M.G., 2003. Morphological changes in hippocampal dentate gyrus synapses following spatial learning in rats are transient. *Eur. J. Neurosci.* 17(9), 1973-1980.
- Fadiga, L., Buccino, G., Craighero, L., Fogassi, L., Gallese, V., Pavesi, G., 1999 Corticospinal excitability is specifically modulated by motor imagery: a magnetic stimulation study. *Neuropsychologia* 37, 147-158.
- Fathi, D., Ueki, Y., Mima, T., Koganemaru, S., Nagamine, T., Tawfik, A., Fukuyama, H., 2010. Effects of aging on the human motor cortical plasticity studied by paired associative stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 120, 90-93.
- Feinberg, I., 1982. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.* 17(4), 319-34.
- Feinberg, I., 1989. Effects of maturation and aging on slow-wave sleep in man: Implications for neurobiology. In: Wauquier, A. D.C., Radulovacki, M., editor. *Slow Wave Sleep: Physiological, Pathophysiological and Functional Aspects*. New York: Raven Press.
- Feinberg, I., Thode Jr, H.C., Chugani, H.T., March, J.D., 1990. Gamma distribution model describes maturational curves for delta wave amplitude, cortical metabolic rate and synaptic density. *J. Theor. Biol.* 142(2), 149-161.
- Feldman, D.E., 2000. Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27, 45-56.
- Ferrara, M., De Gennaro, L., Curcio, G., Cristiani, R., Corvasce, C., et al., 2002. Regional differences of the human sleep electroencephalogram in response to selective slow-wave sleep deprivation. *Cereb. Cortex* 12, 737-748.
- Finelli, L.A., Baumann, H., Borbely, A.A., Achermann, P., 2000. Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep. *Neuroscience* 101, 523-529.
- Finelli, L.A., Borbely, A.A., Achermann, P., 2001. Functional topography of the human nonREM sleep electroencephalogram. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2282-2290.
- Floel, A., Breitenstein, C., Hummel, F., Celnik, P., Gingert, C., Sawaki, L., Knecht, S., Cohen, L.G., 2005. Dopaminergic influences on formation of a motor memory. *Ann. Neurol.* 58,121-130.
- Flor, H., Braun, C., Elbert, T., Birbaumer, N., 1997. Extensive reorganization of primary somatosensory cortex in chronic back pain patients. *Neurosci. Lett.* 224, 5-8.
- Flor, H., Elbert, T., Knecht, S., Wienbruch, C., Pantev, C., Birbaumer, N., Larbig, W., Taub, E., 1995. Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature* 375, 482-484.
- Frank, M.G., Issa, N.P., Stryker, M.P., 2001. Sleep enhances plasticity in the developing visual cortex. *Neuron* 30(1), 275-287.
- Fratello, F., Veniero, D., Curcio, G., Ferrara, M., Marzano, C., Moroni, F., Pellicciari, M.C., Bertini, M., Rossini, P.M., De Gennaro, L., 2006. Modulation of corticospinal excitability by paired associative stimulation: reproducibility of eVects and intraindividual reliability. *Clin. Neurophysiol.* 117, 2667-2674.

- Frith, C.D., Bloxham, C.A., Carpenter, K.N., 1986. Impairments in the learning and performance of a new manual skill in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 49, 661–668.
- Froc, D.J., Chapman, C.A., Trepel, C., Racine, R.J., 2000. Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat. *J. Neurosci.* 20, 438–445.
- Gilestro, G.F., Tononi, G., Cirelli, C., 2009. Widespread changes in synaptic markers as a function of sleep and wakefulness in *Drosophila*. *Science* 324, 109–112.
- Glazewski, S., Herman, C., McKenna, M., Chapman, P.F., Fox, K., 1998. Long-term potentiation in vivo in layers II/III of rat barrel cortex. *Neuropharmacology* 37, 581–592.
- Godde, B., Spengler, F., Dinse, H.R., 1996. Associative pairing of tactile stimulation induces somatosensory cortical reorganization in rats and humans. *Neuroreport* 8, 281–285.
- Grosbras, M.H., Paus, T., 2002. Transcranial magnetic stimulation of the human frontal eye field: effects on visual perception and attention. *J. Cogn. Neurosci.* 14, 1109–1120.
- Hallett, M., 1995. Is dystonia a sensory disorder? *Ann. Neurol.* 38, 139–140.
- Hallett, M., 2004. Dystonia: abnormal movements result from loss of inhibition. *Adv. Neurol.* 94, 1–9.
- Hamdy, S., Rothwell, J.C., Aziz, Q., Singh, K.D., Thompson, D.G., 1998. Long-term reorganization of human motor cortex driven by short-term sensory stimulation. *Nat. Neurosci.* 1, 64–68.
- Hanlon, E.C., Faraguna, U., Vyazovsky, V., Tononi, G., Cirelli, C., 2009. Effects of skilled training on sleep slow wave activity and cortical gene expression in the rat. *Sleep* 32(6), 719–729.
- Hashimoto, I., Mashiko, T., Imada, T., 1996. Somatic evoked high-frequency magnetic oscillations reXect activity of inhibitory interneurons in the human somatosensory cortex. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 100, 189–203.
- Hebb, D.O., 1949. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York: Wiley.
- Hess, G., Donoghue, J.P., 1994. Long-term potentiation of horizontal connections provides a mechanism to reorganize cortical motor maps. *J. Neurophysiol.* 71, 2543–2547.
- Hess, G., Aizenman, C.D., Donoghue J.P., 1996. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J. Neurophysiol.* 75, 1765–1778.
- Herrling, P.L., 1985. Pharmacology of the corticocaudate excitatory postsynaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quisqualate- or kainate-receptors. *Neuroscience* 14, 417–426.
- Heusler, P., Cebulla, B., Boehmer, G., Dinse, H.R., 2000. A repetitive intracortical microstimulation pattern induces long-lasting synaptic depression in brain slices of the rat primary somatosensory cortex. *Exp. Brain Res.* 135, 300–310.
- Heynen, A.J., Yoon, B.J., Liu, C.H., Chung, H.J., Haganir, R.L., Bear, M.F., 2003. Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation. *Nat. Neurosci.* 6(8), 854–862.
- Hill, S., Tononi, G., 2005. Modeling sleep and wakefulness in the thalamocortical system. *J. Neurophysiol.* 93(3), 1671–1698.
- Hodgson, R.A., Ji, Z., Standish, S., Boyd-Hodgson, T.E., Henderson, A.K., Racine, R.J., 2005. Training-induced and electrically induced potentiation in the neocortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83, 22–32.
- Huang, M.X., Aine, C., Davis, L., Butman, J., Christner, R., Weisend, M., Stephen, J., Meyer, J., Silveri, J., Herman, M., Lee, R.R., 2000. Sources on the anterior and posterior banks of the central sulcus identified from magnetic somatosensory evoked responses using multistart spatio-temporal localization. *Hum. Brain Mapp.* 11, 59–76.
- Huber, R., DeBoer, T., Tobler, I., 2000. Topography of EEG dynamics after sleep deprivation in mice. *J. Neurophysiol.* 84, 1888–1893.
- Huang, Y.Z., Edwards, M.J., Rounis, E., Bhatia, K.P., Rothwell, J.C., 2005. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron*, 45, 201–206.
- Huber, R., Esser, S.K., Ferrarelli, F., Massimini, M., Peterson, M.J., Tononi, G., 2007. TMS-induced cortical potentiation during wakefulness locally increases slow wave activity during sleep. *PloS One* 2, e276.
- Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., Ferrarelli, F., Riedner, B.A., Peterson, M.J., Tononi, G., 2006. Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases slow wave activity. *Nat. Neurosci.* 9, 1169–1176.
- Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., Tononi, G., 2004. Local sleep and learning. *Nature* 430(6995), 78–81.
- Huber, R., Maatta, S., Esser, S.K., Sarasso, S., Ferrarelli, F., Watson, A., Ferreri, F., Peterson, M.J., Tononi, G., 2008. Measures of cortical plasticity after transcranial paired associative stimulation predict changes in electroencephalogram slow-wave activity during subsequent sleep. *Jour. Neurosci.* 28(31), 7911–7918.
- Huber, R., Mäki, H., Rosanova, M., Casarotto, S., Canali, P., Adenauer, G., Casali, Tononi, G., Massimini, M., 2012. Cortical excitability increases with time awake. *Cereb. Cortex* doi:10.1093/cercor/bhs014.
- Huntley, G.W., Vickers, J.C., Morrison, J.H., 1994. Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends. Neurosci.* 17, 536–543.

- Huttenlocher, P.R., Dabholkar, A.S., 1997. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387(2), 167–178.
- Iramina, K., Maeno, T., Nonaka, Y., Ueno, S., 2003. Measurement of evoked electroencephalography induced by transcranial magnetic stimulation. *J. Appl. Phys.* 93, 6718–6720.
- Ishikawa, S., Matsunaga, K., Nakanishi, R., Kawahira, K., Murayama, N., Tsuji, S., Huang, Y.Z., Rothwell, J.C., 2007. Effect of theta burst stimulation over the human sensorimotor cortex on motor and somatosensory evoked potentials. *Clin. Neurophysiol.* 118, 1033–1043.
- Jay, T.M., 2003. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 69, 375–390.
- Jones, K., Harrison, Y., 2001. Frontal lobe function, sleep loss and fragmented sleep. *Sleep Med. Rev.* 5, 463–475.
- Kähkönen, S., Komssi, S., Wilenius, J., Ilmoniemi, R.J., 2005a. Prefrontal transcranial magnetic stimulation produces intensity-dependent EEG responses in humans. *NeuroImage* 24, 955–960.
- Kähkönen, S., Wilenius, J., Komssi, S., Ilmoniemi, R.J., 2004. Distinct differences in cortical reactivity of motor and prefrontal cortices to magnetic stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 115, 583–588.
- Kamke, M.R., Hall, M.G., Lye, H.F., Sale, M.V., Fenlon, L.R., Carroll T.J., Riek, S., Mattingley, J.B., 2012. Visual attentional load influences plasticity in the human motor cortex. *J. Neurosci.* 32(20), 7001–7008.
- Kandel, E. R., 1979. Behavioral biology of Aplysia, a contribution to the comparative study of opisthobranch mollusks. San Francisco, CA: Freeman.
- Kang, J.S., Terranova, C., Hilker, R., Quartarone, A., Ziemann, U., 2010. Deficient homeostatic regulation of practice-dependent plasticity in writer's cramp. *Cereb. Cortex* 21(5), 1203–1212.
- Kattler, H., Dijk, D.J., Borbely, A.A., 1994. Effect of unilateral somatosensory stimulation prior to sleep on the sleep EEG in humans. *J. Sleep Res.* 3(3), 159–64.
- Keller, A., Pavlides, C., Asanuma, H., 1990. Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex. *Neuroreport* 1, 49–52.
- Kelly, M.P., Deadwyler, S.A., 2003. Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. *J. Neurosci.* 23(16), 6443–6451.
- Kemp, N., Bashir, Z.I., 2001. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 65(4), 339–365.
- Kennedy, C., Gillin, J.C., Mendelson, W., Suda, S., Miyaoka, M., Ito, M., Nakamura, R.K., Storch, F.I., Pettigrew, K., Mishkin, M., Sokoloff, L., 1982. Local cerebral glucose utilization in non-rapid eye movement sleep. *Nature* 297, 325–327.
- Kita, H., 1996. Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience* 70, 925–940.
- Kitagawa, H., Nishimura, Y., Yoshioka, K., Lin, M., Yamamoto, T., 1997. Long-term potentiation and depression in layer III and V pyramidal neurons of the cat sensorimotor cortex in vitro. *Brain Res.* 751, 339–343.
- Kleim, J.A., Barbay, S., Nudo, R.J., 1998. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J. Neurophysiol.* 80, 3321–3325.
- Klintsova, A.Y., Greenough, W.T., 1999. Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(2), 203–208.
- Knecht, S., Henningsen, H., Elbert, T., Flor, H., Hohling, C., Pantev, C., Taub, E., 1996. Reorganizational and perceptual changes after amputation. *Brain* 119, 1213–1219.
- Knott, G.W., Quairiaux, C., Genoud, C., Welker, E., 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34(2), 265–273.
- Kofler, M., Donovan, W.H., Loubser, P.G., Beric, A., 1992. Effects of intrathecal baclofen on lumbosacral and cortical somatosensory evoked potentials. *Neurology* 42, 864–868.
- Komssi, S., Aronen, H.J., Huttunen, J., Kesäniemi, M., Soenne, L., Nikouline, V.V., Ollikainen, M., Roine, R.O., Karhu, J., Savolainen, S., Ilmoniemi, R.J., 2002. Ipsi- and contralateral EEG reactions to transcranial magnetic stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 113, 175–184.
- Komssi, S., Kähkönen, S., Ilmoniemi, R.J., 2004. The effect of stimulus intensity on brain responses evoked by transcranial magnetic stimulation. *Hum. Brain Mapp.* 21, 154–164.
- Kreuzer, P., Langguth, B., Popp, R., Raster, R., Busch, V., Frank, E., Hajak, G., Landgrebe, M., 2011. Reduced intra-cortical inhibition after sleep deprivation: a transcranial magnetic stimulation study. *Neurosci. Lett.* 493(3), 63–66.
- Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C., 2000. (eds.) Principles and Practice of Sleep Medicine (W.B. Saunders, Philadelphia).
- Kudrimoti, H.S., Barnes, C.A., McNaughton, B.L., 1999. Reactivation of hippocampal cell assemblies: effects of behavioral state, experience, and EEG dynamics. *J. Neurosci.* 19(10), 4090–4101.
- Kujirai, T., Caramia, M.D., Rothwell, J.C., Day, B.L., Thompson, P.D., Ferbert, A., Wroe, S., Asselman, P., Marsden, C.D., 1993. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J. Physiol.* 471, 501–519.
- Lee, E.K., Seyal, M., 1998. Generators of short latency human somatosensory-evoked potentials recorded over the spine and scalp. *J. Clin. Neurophysiol.* 15, 227–234.

- Legatt, A.D., Kader, A., 2000. Topography of the initial cortical component of the median nerve somatosensory evoked potential. Relationship to central sulcus anatomy. *J. Clin. Neurophysiol.* 17, 321–325.
- Levy, L.M., Ziemann, U., Chen, R., Cohen, L.G., 1999. Rapid modulation of GABA in human cortical plasticity demonstrated by magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 52 (6 Suppl. 2), A88.
- Liepert, J., Schwenkreis, P., Tangenthoff, M., Malin, J.P., 1997. Glutamate antagonist riluzole suppresses intracortical facilitation. *J. Neural Transm.* 104, 1207–1214.
- Liepert, J., Terborg, C., Weiller, C., 1999. Motor plasticity induced by synchronized thumb and foot movements. *Exp. Brain Res.* 125, 435–439.
- Litvak, V., Zeller, D., Oostenveld, R., Maris, E., Cohen, A., Schramm, A., et al., 2007. LTP-like changes induced by paired associative stimulation of the primary somatosensory cortex in humans: source analysis and associated changes in behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2862–74.
- Liu, Z.W., Faraguna, U., Cirelli, C., Tononi, G., Gao, X.B., 2010. Direct evidence for wake-related increases and sleep-related decreases in synaptic strength in rodent cortex. *J. Neurosci.* 30(25), 8671–8675.
- Makeig, S., Inlow, M., 1993. Lapses in alertness: coherence of fluctuations in performance and EEG spectrum. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 86(1), 23–35.
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126.
- Malow, B.A., 2004. Sleep deprivation and epilepsy. *Epilepsy Curr.* 4, 193–195.
- Man, H.Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., et al., 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25(3), 649–662.
- Manganotti, P., Bongiovanni, L.G., Fuggetta, G., Zanette, G., Fiaschi, A., 2006. Effects of sleep deprivation on cortical excitability in patients affected by juvenile myoclonic epilepsy: a combined transcranial magnetic stimulation and EEG study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 56–60.
- Manganotti, P., Palermo, A., Patuzzo, S., Zanette, G., Fiaschi, A., 2001. Decrease of cortical excitability in human subjects after sleep deprivation. *Neurosci. Lett.* 304, 153–156.
- Marsden, C.D., Sheehy, M.P., 1990. Writer's cramp. [Review]. *Trends Neurosci.* 13, 148–153.
- Massimini, M., Ferrarelli, F., Esser S.K., Riedner B.A., Huber, R., Murphy M., Peterson M.J., Tononi, G., 2007. Triggering sleep slow waves by transcranial magnetic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(20), 8496–8501.
- Matsunaga, K., Nitsche, M.A., Tsuji, S., Rothwell, J.C., 2004. Effect of transcranial DC sensorimotor cortex stimulation on somatosensory evoked potentials in humans. *Clin. Neurophysiol.* 115, 456–460.
- Mauguiere, F., Allison, T., Babiloni, C., Buchner, H., Eisen, A.A., Goodin, D.S., Jones, S.J., Kakigi, R., Matsuoka, S., Nuwer, M., Rossini, P.M., Shibasaki, H., 1999. Somatosensory evoked potentials. The International Federation of Clinical Neurophysiology. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.* 52, 79–90.
- McDonnell, M.N., Orekhov, Y., Ziemann, U., 2007. Suppression of LTP-like plasticity in human motor cortex by the GABAB receptor agonist baclofen. *Exp. Brain Res.* 180, 181–186.
- McKay, D.R., Ridding, M.C., Thompson, P.D., Miles, T.S., 2002. Induction of persistent changes in the organisation of the human motor cortex. *Exp. Brain Res.* 143, 342–349.
- McLaughlin, D.F., Kelly, E.F., 1993. Evoked potentials as indices of adaptation in the somatosensory system in humans: a review and prospectus. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18, 151–206.
- Meerlo, P., de Bruin, E.A., Strijkstra, A.M., Daan, S., 2001. A social conflict increases EEG slow-wave activity during subsequent sleep. *Physiol. Behav.* 73(3), 331–335.
- Meunier, S., Russmann, H., Simonetta-Moreau, M., Hallett, M., 2007. Changes in spinal excitability after PAS. *J. Neurophysiol.* 97, 3131–3135.
- Moller, A.R., Jannetta, P.J., Burgess, J.E., 1986. Neural generators of the somatosensory evoked potentials: recording from the cuneate nucleus in man and monkeys. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 65, 241–248.
- Monfils, M.H., Teskey, G.C., 2004. Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation. *Neuroscience* 125, 329–336.
- Monk, T.H., 1987. Subjective ratings of sleepiness—the underlying circadian mechanisms. *Sleep* 10, 343–353.
- Morita, H., Baumgarten, J., Petersen, N., Christensen, L.O., Nielsen, J., 1999. Recruitment of extensor-carpi-radialis motor units by transcranial magnetic stimulation and radial-nerve stimulation in human subjects. *Exp. Brain Res.* 128, 557–562.
- Mu, Q., Nahas, Z., Johnson, K.A., Yamanaka, K., Mishory, A., Koola, J., Hill, S., Horner, M.D., Bohning, D.E., George, M.S., 2005. Decreased cortical response to verbal working memory following sleep deprivation. *Sleep* 28, 55–67.
- Muellbacher, W., Ziemann, U., Boroojerdi, B., Cohen, L.G., Hallett, M., 2001. Role of the human motor cortex in rapid motor learning. *Exp. Brain Res.* 136, 431–438.
- Muellbacher, W., Ziemann, U., Wissel, J., Dang, N., Kofler, M., Facchini, S., Boroojerdi, B., Poewe, W., Hallett, M., 2002. Early consolidation in human primary motor cortex. *Nature* 415, 640–644.

- Muller, J.F.M., Orekhov, Y., Liu, Y., Ziemann, U., 2007. Homeostatic plasticity in human motor cortex demonstrate by two consecutive sessions of paired associative stimulation. *Euro. Journ. Neurisci.* 25, 3461-3468.
- Muller-Dahlhaus, J.F.M., Orekhov, Y., Liu, Y., Ziemann, U., 2008. Interindividual variability and age-dependency of motor cortical plasticity induced by paired associative stimulation. *Exp. Brain Res.* 187, 467-475.
- Murakami, T., Sakuma, K., Nomura, T., Uemura, Y., Hashimoto, I., Nakashima, K., 2008. Changes in somatosensory-evoked potentials and high-frequency oscillations after paired-associative stimulation. *Exp. Brain Res.* 184, 339-347.
- Murck, H., Struttman, T., Czisch, M., Wetter, T., Steiger, A., Auer, D.P., 2002. Increase in amino acids in the pons after sleep deprivation: a pilot study using proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuropsychobiology* 45, 120-123.
- Nikulin, V.V., Kicic, D., Kähkönen, S., Ilmoniemi, R.J., 2003. Modulation of electroencephalographic responses to transcranial magnetic stimulation: evidence for changes in cortical excitability related to movement. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1206-1212.
- Nudo, R.J., Milliken, G.W., Jenkins, W.M., Merzenich, M.M., 1996. Usedependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J. Neurosci.* 16, 785-807.
- Nuwer, M.R., Comi, G., Emerson, R., Fuglsang-Frederiksen, A., Guerit, J.M., et al., 1998. IFCN standards for digital recording of clinical EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 106, 259-261.
- Odergren, T., Iwasaki, N., Borg, J., Forssberg, H., 1996. Impaired sensorymotor integration during grasping in writer's cramp. *Brain* 119, 569-583.
- Oliveri, M., Rossini, P.M., Pascualetti, P., Traversa, R., Cicinelli, P., Palmieri, M.G., Tomaiuolo, F., Caltagirone, C., 1999a. Interhemispheric asymmetries in the perception of unimanual and bimanual cutaneous stimuli. A study using transcranial magnetic stimulation. *Brain* 122, 1721-1729.
- Oliveri, M., Rossini, P.M., Traversa, R., Cicinelli, P., Filippi, M.M., Pascualetti, P., Tomaiuolo, F., Caltagirone, C., 1999. Left frontal transcranial magnetic stimulation reduces contralesional extinction in patients with unilateral right brain damage. *Brain* 122, 1731-1739.
- Oliveri, M., 2001. rTMS of the unaffected hemisphere transiently reduces contralesional visuospatial hemineglect. *Neurology* 57, 1338-1340.
- Oliveri, M., Babiloni, C., Filippi, M.M., Caltagirone, C., Babiloni, F., Cicinelli, P., Traversa, R., Palmieri, M.G., Rossini, P.M., 2003. Influence of the supplementary motor area on primary motor cortex excitability during movements triggered by neutral or emotionally unpleasant visual cues. *Exp. Brain Res.* 149, 214-221.
- Otani, S., Daniel, H., Roisin, M.P., Crepel, F., 2003. Dopaminergic modulation of long-term synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Cereb. Cortex* 13, 1251-1256.
- Ouchi, Y., Kanno, T., Okada, H., et al., 1999. Presynaptic and postsynaptic dopaminergic binding densities in the nigrostriatal and mesocortical systems in early Parkinson's disease: a double tracer positron emission tomography study. *Ann. Neurol.* 46, 723-731.
- Palchykova, S., Deboer, T. & Tobler, I., 2002. Selective sleep deprivation after daily torpor in the Djungarian hamster. *J. Sleep Res.* 11, 313-319.
- Pascual-Leone, A., Nguyet, D., Cohen, L.G. J.P., Cammarota, A., Hallett, M., 1995. Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J. Neurophysiol.* 74, 1037-1045.
- Paus, T., Sipilä, P.K., Strafella, P., 2001. Synchronization of neuronal activity in the human primary motor cortex by transcranial magnetic stimulation: an EEG study. *J. Neurophysiol.* 86, 1983-1990.
- Peinemann, A., Lehner, C., Conrad, B., Siebner, H.R., 2001. Age-related decrease in paired-pulse intracortical inhibition in the human primary motor cortex. *Neurosci. Lett.* 313, 33-36.
- Pellicciari, M.C., Miniussi, C., Rossini, P.M., De Gennaro, L., 2009. Increased cortical plasticity in the elderly: changes in the somatosensory cortex after paired associative stimulation. *Neuroscience* 163(1), 266-276.
- Petit, D., Gagnon, J.F., Fantini, M.L., Ferini-Strambi, L., Montplaisir, J., 2004. Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *J. Psychosom. Res.* 56(5), 487-496.
- Picconi, B., Gardoni, F., Centonze, D., et al. 2004. Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J. Neurosci.* 24, 5283-5291.
- Pindt, H.S., Ridding, M.C., 2004. Modification of the human motor cortex by associative stimulation. *Exp. Brain Res.* 159, 123-128.
- Pitcher, J.B., Ogston, K.M., Miles, T.S., 2003. Age and sex differences in human motor cortex input-output characteristics. *J. Physiol.* 546, 605-613.
- Pleger, B., Dinse, H.R., Ragert, P., Schwenkreis, P., Malin, J.P., Tegenthoff, M., 2001. Shifts in cortical representations predict human discrimination improvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 12255-12260.
- Portas, C.M., Rees, G., Howseman, A.M., Josephs, O., Turner, R., Frith, C.D., 1998. A specific role for the thalamus in mediating the interaction of attention and arousal in humans. *J. Neurosci.* 18, 8979-8989.

- Post, A., Keck, M.E., 2001. Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms? *J. Psychiatr. Res.* 35, 193–215.
- Quartarone, A., Bagnato, S., Rizzo, V., Siebner, H.R., Dattola, V., Scalfari, A., Morgante, F., Battaglia, F., Romano, M., Girlanda, P., 2003. Abnormal associative plasticity of the human motor cortex in writer's cramp. *Brain* 126, 2586-2596.
- Ragert, P., Becker, M., Tegenthoff, M., Pleger, B., Dinse, H.R., 2004. Sustained increase of somatosensory cortex excitability by 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation studied by paired median nerve stimulation in humans. *Neurosci. Lett.* 356, 91–94.
- Rami, L., Gironell, A., Kulisevsky, J., García-Sánchez, C., Berthier, M., Estévez-González, A., 2003. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on memory subtypes: a controlled study. *Neuropsychologia* 41, 1877–1883.
- Ridding, M.C., Brouwer, B., Miles, T.S., Pitcher, J.B., Thompson, P.D., 2000. Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. *Exp. Brain Res.* 131, 135–143.
- Ridding, M.C., McKay, D.R., Thompson, P.D., Miles, T.S., 2001. Changes in corticomotor representations induced by prolonged peripheral nerve stimulation in humans. *Clin. Neurophysiol.* 112, 1461–1469.
- Ridding, M.C., Rothwell, J.C., 1995. Reorganisation in human motor cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 218–222.
- Ridding, M.C., Rothwell, J.C., 1997. Stimulus/response curves as a method of measuring motor cortical excitability in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 105, 340-344.
- Ridding, M.C., Taylor, J.L., 2001. Mechanisms of motor-evoked potential facilitation following prolonged dual peripheral and central stimulation in humans. *J. Physiol. (Lond.)* 537, 623–631.
- Ridding, M.C., Uy, J., 2003. Changes in motor cortical excitability induced by paired associative stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 114, 1437-1444.
- Rinne, J.O., Portin, R., Ruottinen, H., et al., 2000. Cognitive impairment and the brain dopaminergic system in Parkinson disease: [18F]fluorodopa positron emission tomographic study. *Arch. Neurol.* 57, 470–475.
- Rioult-Pedotti, M.S., Friedman, D., Hess, G., Donoghue, J.P., 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat. Neurosci.* 1, 230–234.
- Rioult-Pedotti, M.S., Friedman, D., Donoghue, J.P., 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290, 533–536.
- Robbins, T.W., Everitt, B.J., 1995. Central norepinephrine neurons and behavior. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, p. 363.
- Rogers, R.D., Monsell, S., 1995: The costs of a predictable switch between simple cognitive tasks. *J. Exp. Psychol. Gen.* 124, 207-231.
- Rosenkranz, K., Rothwell, J.C., 2006 Differences between the effects of three plasticity inducing protocols on the organization of the human motor cortex. *Eur. J. Neurosci.* 23, 822–829.
- Rosenkranz, K., Williamon, A., Rothwell, J.C., 2007. Motorcortical excitability and synaptic plasticity is enhanced in professional musicians. *J. Neurosci.* 27, 5200–5206.
- Rossi, S., Pasqualetti, P., Tecchio, F., Pauri, F., Rossini P.M., 1998 Corticospinal excitability modulation during mental simulation of wrist movements in normal subjects. *Neurosci. Lett.* 243, 1–5.
- Rossi, S., Cappa, S.F., Babiloni, C., Pasqualetti, P., Miniussi, C., Carducci, F., Babiloni, F., Rossini, P.M., 2001. Prefrontal cortex in long-term memory: an “interference” approach using magnetic stimulation. *Nat. Neurosci.* 4, 948–952.
- Rossi, S., Ulivelli, M., Bartalini, S., Galli, R., Passero, S., Battistini, N., Vatti, G., 2004. Reduction of cortical myoclonus-related epileptic activity after slow-frequency rTMS. A case study. *Neuroreport* 15, 293–296.
- Rossini, P.M., Gigli, G.L., Marciani, M.G., Zarola, F., Caramia, M., 1987. Non-invasive evaluation of input-output characteristics of sensorimotor cerebral areas in healthy humans. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 68, 88-100.
- Rossini, P.M., Barker, A.T., Berardelli, A., Caramia, M.D., Caruso, G., Cracco, R.Q., Dimitrijević, M.R., Hallett, M., Katayama, Y., Lücking, C.H., Maertens de Noordhout, A., Marsden, C., Murray, N., Rothwell, J., Swash, M., Tomberg, C., 1994. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 91, 79-92.
- Rossini, P.M., Rossi, S., Pasqualetti, P., Tecchio, F., 1999. Corticospinal excitability modulation to hand muscles during movement imagery. *Cereb. Cortex* 9, 161–167.
- Sale, M.V., Ridding, M.C., Nordstrom, M.A., 2007. Factors influencing the magnitude and reproducibility of corticomotor excitability changes induced by paired associative stimulation. *Exp. Brain Res.* 181(4), 615–626.
- Sallanon-Moulin, M., Touret, M., Didier-Bazes, M., Roudier, V., Fages, C., Tardy, M., Jouvet, M., 1994. Glutamine synthetase modulation in the brain of rats subjected to deprivation of paradoxical sleep. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 22, 113–120.
- Sandrini, M., Cappa, S.F., Rossi, S., Rossini, P.M., Miniussi, C., 2003. The role of prefrontal cortex in verbal episodic memory: rTMS evidence. *J. Cogn. Neurosci.* 15, 855–861.

- Sanes, J.N., Donoghue, J.P., 2000. Plasticity and primary motor cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 393–415.
- Sanger, T.D., Pascual-Leone, A., Tarsy, D., Schlaug, G., 2002. Nonlinear sensory cortex response to simultaneous tactile stimuli in writer's cramp. *Mov. Disord.* 17, 105–111.
- Sawaki, L., Yaseen, Z., Kopylev, L., Cohen, L.G., 2003. Age-dependent changes in the ability to encode a novel elementary motor memory. *Ann. Neurol.* 53, 521–524.
- Schlaghecken, F., Munchau, A., Bloem, B., Rothwell, J.C., Eimer, M., 2001. Effects of premotor cortex repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on reaction times in a masked priming task. *Human Brain Mapping Abstracts* 1252.
- Schnider, A., Butbrod, K., Hess, C.W., 1995. Motion imagery in Parkinson's disease. *Brain* 118, 485–493.
- Schwenkreis, P., Liepert, J., Witscher, K., Fischer, W., Weiller, C., Malin, J.P., Tegenthoff, M., 2000. Riluzole suppresses motor cortex facilitation in correlation to its plasma level. A study using transcranial magnetic stimulation. *Exp. Brain Res.* 135, 293–299.
- Schwierin, B., Achermann, P., Deboer, T., Oleksenko, A., Borbely, A.A., Tobler, I., 1999. Regional differences in the dynamics of the cortical EEG in the rat after sleep deprivation. *Clin. Neurophysiol.* 110, 869–875.
- Seyal, M., Tony, R., Rafal, R., 1995. Increased sensitivity to ipsilateral cutaneous stimuli following transcranial magnetic stimulation of the parietal lobe. *Ann. Neurol.* 38, 264–267.
- Shadmehr, R., Brashers-Krug, T., 1997. Functional stages in the formation of human long-term motor memory. *J. Neurosci.* 17, 409–419.
- Sheng, M., Hyoung Lee, S., 2003. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: major unanswered questions. *Neurosci. Res.* 46(2), 127–34.
- Siebner, H.R., Tormos, J. M., Ceballos- Baumann, A.O., Auer C., Catala M.D., Conrad B., Pascual-Leone, A., 1999. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in writer's cramp. *Neurology* 52, 529–537.
- Simon, C., Brandenberger, G., Saini, J., Ehrhart, J., Follenius, M., 1994. Slow oscillations of plasma glucose and insulin secretion rate are amplified during sleep in humans under continuous enteral nutrition. *Sleep* 17(4), 333–338.
- Sjostrom, P.J., Turrigiano, G.G., Nelson, S.B., 2001. Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32(6), 1149–1164.
- Smiley-Oyen, A.L., Worringham, C.J., Cross, C.L., 2003. Motor learning processes in a movement-scaling task in olivopontocerebellar atrophy and Parkinson's disease. *Exp. Brain Res.* 152, 453–465.
- Smolen, P., 2007. A model of late long-term potentiation simulates aspects of memory maintenance. *PLoS One* 2(5), e445.
- Song, S., Miller, K.D., Abbott, L.F., 2000. Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 3, 919–926.
- Sonoo, M., Genba-Shimizu, K., Mannen, T., Shimizu, T., 1997. Detailed analysis of the latencies of median nerve somatosensory evoked potential components, 2: Analysis of subcomponents of the P13/14 and N20 potentials. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 104, 296–311.
- Soto, C., Martin-Cora, F., Leiras, R., Velo, P., Canedo, A., 2006. GABA(B) receptor-mediated modulation of cutaneous input at the cuneate nucleus in anesthetized cats. *Neuroscience* 137, 1015–1030.
- Sowell, E.R., Thompson, P.M., Tessner, K.D., Toga, A.W., 2001. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J. Neurosci.* 21(22), 8819–8829.
- Stäubli, U., ScaWdi, J., Chun, D., 1999. GABAB receptor antagonism: facilitatory effects on memory parallel those on LTP induced by TBS but not HFS. *J. Neurosci.* 19, 4609–4615.
- Stefan, K., Kunesch, E., Cohen, L.G., Benecke, R., Classen, J., 2000. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain* 123, 572–584.
- Stefan, K., Kunesch, E., Benecke, R., Cohen, L.G., Classen, J., 2002. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J. Physiol.* 543, 699–708.
- Stefan, K., Wycislo, M., Classen, J., 2004. Modulation of associative human motor cortical plasticity by attention. *J. Neurophysiol.* 92, 66–72.
- Stefan, K., Wycislo, M., Gentner, R., Schramm, A., Naumann, M., Reiners, K., Classen, J., 2006. Temporary occlusion of associative motor cortex plasticity by prior dynamic motor training. *Cereb. Cortex* 16, 376–385.
- Steriade, M., 2003. The corticothalamic system in sleep, *Front. Biosci.* 8, D878–D899.
- Stickgold, R., 2005. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature* 437, 1272–1278.
- Stinear, J.W., Hornby, T.J., 2005. Stimulation-induced changes in lower limb corticomotor excitability during treadmill walking in humans. *J. Physiol.* 567.2, 701–711.
- Tamburin, S., Manganotti, P., Marzi, C.A., Fiaschi, A., Zanette, G., 2002. Abnormal somatotopic arrangement of sensorimotor interactions in dystonic patients. *Brain* 125, 2719–2730.
- Tamura, Y., Matsushashi, M., Lin, P., Ou, B., Vorbach, S., Kakigi, R., et al., 2008. Impaired intracortical inhibition in the primary somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Mov. Disord.* 23, 558–65.

- Tamura, Y., Okabe, S., Ohnishi, T., Saito, D.N., Arai, N., Mochio, S., Inoue, K., Ugawa, Y., 2004. Effects of 1-Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on acute pain induced by capsaicin. *Pain* 107, 107–115.
- Tamura, Y., Ueki, Y., Lin, P., Vorbach, S., Mima, T., Kakigi, R., Hallett, M., 2009. Disordered plasticity in the primary somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Brain* 132, 1–7.
- Tecchio, F., Zappasodi, F., Pasqualetti, P., De Gennaro, L., Pellicciari, M.C., Ercolani, M., Squitti, R., Rossini, P.M., 2008. Age dependence of primary motor cortex plasticity induced by paired associative stimulation. *Clinic. Neurophysiol.* 119, 675–682.
- Tempel, L.W., Perlmutter, J.S., 1990. Abnormal vibration-induced cerebral blood flow responses to idiopathic dystonia. *Brain* 113, 691–707.
- Thomas, M., Sing, H., Belenky, G., Holcomb, H., Mayberg, H., Dannals, R., Wagner, H., Thorne, D., Popp, K., Rowland, L., Welsh, A., Balwinski, S., Redmond, D., 2000. Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *J. Sleep Res.* 9, 335–352.
- Thomas, M., Sing, H., Belenky, G., Holcomb, H., Mayberg, H., Dannals, R., Wagner, H., Thorne, D., Popp, K., Rowland, L., Welsh, A., Balwinski, S., Redmond, D., 2003. Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness II. Effects of 48 and 72 hours of sleep deprivation on waking human brain activity. *Thalamus Relat. Syst.* 2, 199–229.
- Tinazzi, M., Priori, A., Bertolasi, L., Frasson, E., Manguiere, F., Fiaschi, A., 2000. Abnormal central integration of a dual somatosensory input in dystonia. Evidence for sensory overflow. *Brain* 123, 42–50.
- Tinazzi, M., Valeriani, M., Moretto, G., Rosso, T., Nicolato, A., Fiaschi, A., Aglioti, S.M., 2004. Plastic interactions between hand and face cortical representations in patients with trigeminal neuralgia: a somatosensory-evoked potentials study. *Neuroscience* 127, 769–776.
- Tinazzi, M., Zanette, G., Polo, A., Volpato, D., Manganotti, P., Bonato, C., Testoni, R., Fiaschi, A., 1997. Transient deafferentation in humans induces rapid modulation of primary sensory cortex not associated with subcortical changes: a somatosensory evoked potential study. *Neurosci. Lett.* 223, 21–24.
- Tinazzi, M., Zanette, G., Volpato, D., Testoni, R., Bonato, C., Manganotti, P., Miniussi, C., Fiaschi, A., 1998. Neurophysiological evidence of neuroplasticity at multiple levels of the somatosensory system in patients with carpal tunnel syndrome. *Brain* 121, 1785–1794.
- Tinguely, G., Finelli, L.A., Landolt, H.P., Borbely, A.A., Achermann, P., 2006. Functional EEG topography in sleep and waking: state-dependent and state-independent features. *NeuroImage* 32, 283–292.
- Tononi, G., Cirelli, C., 2001. Some considerations on sleep and neural plasticity. *Arch. Ital. Biol.* 139(3), 221–241.
- Tononi, G., Cirelli, C., 2003. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res. Bull.* 62, 143–150.
- Tononi, G., Cirelli, C., 2006. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 10(1), 49–62.
- Tononi, G., Cirelli, C., Pompeiano, M., 1995. Changes in gene expression during the sleep-waking cycle: a new view of activation systems. *Arch. Ital. Biol.* 134(1), 21–37.
- Tsuji, T., Rothwell, J.C., 2002. Long lasting effects of rTMS and associated peripheral sensory input on MEPs, SEPs and transcortical reflex excitability in humans. *J. Physiol.* 540, 367–376.
- Turrigiano, G.G., 1999. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci.* 22(5), 221–227.
- Turrigiano, G.G., 2000. AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* 26(1), 5–8.
- Ueki, Y., Mima, T., Kotb M.A., Sawada, H., Saiki, H., Ikeda, A., Begum, T., Reza, F., Nagamine, T., Fukuyama, H., 2006. Altered plasticity of the human motor cortex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 59, 60–71.
- Urban, J., Kossut, M., Hess, G., 2002. Long-term depression and long-term potentiation in horizontal connections of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1772–1776.
- Urbano, A., Babiloni, F., Babiloni, C., Ambrosini, A., Onorati, P., Rossini, P.M., 1997. Human short latency cortical responses to somatosensory stimulation. A high resolution EEG study. *Neuroreport* 8, 3239–3243.
- Uy, J., Ridding, M.C., Hillier, S., Thompson, P.D., Miles, T.S., (2003). Does induction of plastic change in motor cortex improve leg function after stroke? *Neurology* 61, 982–984.
- Vyazovskiy, V., Borbely, A.A., Tobler, I., 2000. Unilateral vibrissae stimulation during waking induces inhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat. *J. Sleep Res.* 9(4), 367–371.
- Vyazovskiy, V., Borbely, A.A., Tobler, I., 2002. Interhemispheric sleep EEG asymmetry in the rat is enhanced by sleep deprivation. *J. Neurophysiol.* 88, 2280–2286.
- Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., Tononi, G., 2008. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat. Neurosci.* 11, 200–208.
- Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Tononi, G., Tobler, I., 2008. Cortical metabolic rates as measured by 2-deoxyglucose-uptake are increased after waking and decreased after sleep in mice. *Brain Res. Bull.* 75, 591–597.

- Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Cirelli, C., Tononi, G., 2012. Prolonged wakefulness alters neuronal responsiveness to local electrical stimulation of the neocortex in awake rats. *J. Sleep Res.*, DOI: 10.1111/jsr.12009.
- Vyazovskiy, V.V., Ruijgrok, G., Deboer, T., Tobler, I., 2006. Running Wheel Accessibility Affects the Regional Electroencephalogram during Sleep in Mice. *Cereb. Cortex* 16, 328-336.
- Vyazovskiy, V., Welker, E., Fritschy, J.M., Tobler, I. 2004. Regional pattern of metabolic activation is reflected in the sleep EEG after sleep deprivation combined with unilateral whisker stimulation in mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1363-1370.
- Walling, S.G., Harley, C.W., 2004. Locus ceruleus activation initiates delayed synaptic potentiation of perforant path input to the dentate gyrus in awake rats: a novel beta-adrenergic and protein synthesis-dependent mammalian plasticity mechanism. *J. Neurosci.* 24(3), 598–604.
- Walker, M.P., Brakefield, T., Morgan, A., Hobson, J.A., Stickgold, R., 2002. Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning. *Neuron* 35, 205–211.
- Ward, N.S., Swayne, O.B., Newton, J.M., 2007. Age-dependent changes in the neural correlates of force modulation: an fMRI study. *Neurobiol. Aging* (in press).
- Wassermann, E.M., 2002. Variation in the response to transcranial magnetic brain stimulation in the general population. *Clin. Neurophysiol.* 113, 1165–1171.
- Werk, C.M., Chapman, C.A., 2003. Long-term potentiation of polysynaptic responses in layer V of the sensorimotor cortex induced by theta-patterned tetanization in the awake rat. *Cereb. Cortex* 13, 500–507.
- Werk, C.M., Klein, H.S., Nesbitt, C.E., Chapman, C.A., 2006. Long-term depression in the sensorimotor cortex induced by repeated delivery of 10 Hz trains *in vivo*. *Neuroscience* 140, 13-20.
- Wolters, A., Sandbrink, F., Schlottmann, A., Kunesch, E., Stefan, K., Cohen, L.G., Benecke, R., Classen, J., 2003. A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J. Neurophysiol.* 89, 2339–2345.
- Wolters, A., Schmidt, A., Schramm, A., Zeller, D., Naumann, M., Kunesch, E., Benecke, R., Reiners, K., Classen, J., 2005. Timing-dependent plasticity in human primary somatosensory cortex. *J. Physiol.* 565, 1039-1052.
- Wong, B.Y., Coulter, D.A., Choi, D.W., Prince, D.A., 1988. Dextrorphan and dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices. *Neurosci. Lett.* 85, 261–266.
- Wu, J.C., Gillin, J.C., Buchsbaum, M.S., Hershey, T., Hazlett, E., Sicotte, N., Bunney Jr., W.E., 1991. The effect of sleep deprivation on cerebral glucose metabolic rate in normal humans assessed with positron emission tomography. *Sleep* 14, 155–162.
- Ziemann, U., Corwell, B., Cohen, L.G., 1998a. Modulation of plasticity in human motor cortex after forearm ischemic nerve block. *J. Neurosci.* 18, 1115–1123.
- Ziemann, U., Corwell, B., Cohen, L.G., 1998b. Modulation of plasticity in human motor cortex after forearm ischemic nerve block. *J. Neurosci.* 18, 1115–1123.
- Ziemann, U., Hallett, M., Cohen, L.G., 1998c. Mechanisms of deafferentation-induced plasticity in human motor cortex. *J. Neurosci.* 18, 7000–7007.
- Ziemann, U., Lonnecker, S., Steinhoff, B.J., Paulus, W., 1996. Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. *Ann. Neurol.* 40, 367–378.
- Ziemann, U., Rothwell, J.C., 2000. I-waves in motor cortex. *J. Clin. Neurophysiol.* 17, 397–405.
- Ziemann, U., Wittenberg, G.F., Cohen, L.G., 2002. Stimulation-induced within-representation and across-representation plasticity in human motor cortex. *J. Neurosci.* 22, 5563–5571.
- Ziemann, U., Iliac, T.V., Pauli, C., Meintzschel, F., Ruge, D., 2004. Learning modifies subsequent induction of long-term potentiation-like and long-term depression-like plasticity in human motor cortex. *J. Neurosci.* 24, 1666--1672.