

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOTORIE**  
**XXIII CICLO**

---

**Graziella Croazzo**

***Studio comparativo dell'attività dei neuroni  
pre-cerebellari e cerebellari durante  
movimenti passivi dell'arto anteriore del ratto***

**TESI DI DOTTORATO**

**Coordinatore:**

***Chiar.mo Prof. Vincenzo Perciavalle***

**Tutor:**

***Chiar.ma Prof.ssa Maria Stella Valle***

---

**ANNO ACCADEMICO 2010- 2011**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
ORGANIZZAZIONE MORFO-FUNZIONALE DEL CERVELLETTO	4
ORGANIZZAZIONE DELLE AFFERENZE AL CERVELLETTO.	8
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>11</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>13</b>
PREPARAZIONE DELL'ANIMALE	13
REGISTRAZIONE E ISTOLOGIA	13
MOVIMENTI PASSIVI DELL'ARTO ANTERIORE	15
ANALISI DELL'ATTIVITÀ NEURONALE	18
<b>RISULTATI</b>	<b>21</b>
RISPOSTE NEURONALI	21
RELAZIONI FRA L'ATTIVITÀ DI SCARICA DEI NEURONI E POSIZIONE DELLA ZAMPA	23
ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI	23
ANALISI DI REGRESSIONE A VARIABILI MULTIPLE	28
RELAZIONI FRA L'ATTIVITÀ DI SCARICA DEI NEURONI E LA VELOCITÀ DEL MOVIMENTO	31
RISPOSTE NEURONALI	31
ANALISI DI REGRESSIONE A VARIABILI MULTIPLE	31
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>37</b>
ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI E RAPPRESENTAZIONE DEI PARAMERI DELL'ARTO	37
CODIFICA PRE-CEREBELLARE E DELLA CORTECCIA CEREBELLARE INTERMEDIA DEI SEGNALI SENSORIALI	38
RUOLI SEPARATI DELLA CORTECCIA CEREBELLARE INTERMEDIA E DEL NUCLEO INTERPOSITO NEL CODIFICARE I SEGNALI SENSORIALI	40
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>45</b>

## RIASSUNTO

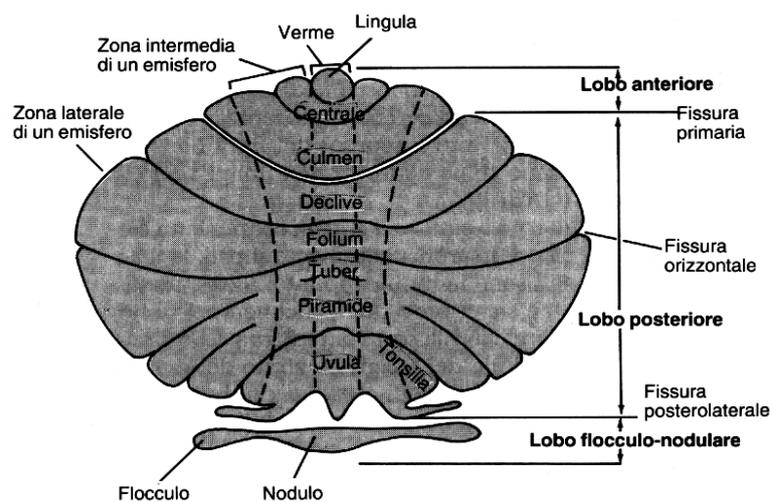
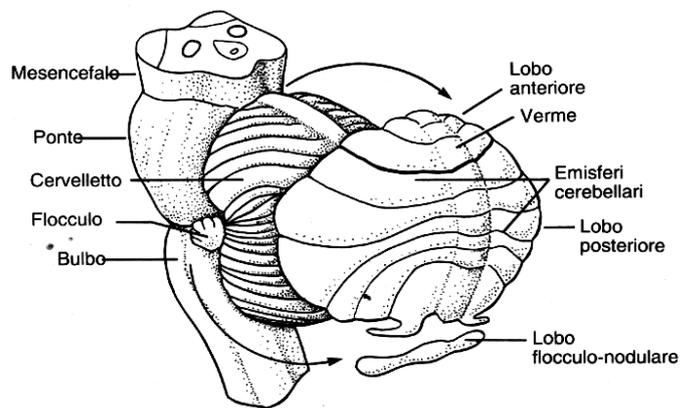
In questa tesi sono state studiate le attività neuronali del nucleo cuneato esterno, delle cellule del Purkinje del cervelletto intermedio e del nucleo interposito durante movimenti passivi dell'arto anteriore in ratti anestetizzati. Lo scopo principale di questo studio era quello di identificare e comparare gli schemi di attivazione neuronale tra le strutture precerebellari e cerebellari. L'attività di scarica dei neuroni è stata correlata con diversi aspetti della cinematica del movimento dell'arto riguardanti sia le caratteristiche del vettore velocità che la posizione. I dati sulla posizione dell'arto sono stati studiati applicando la tecnica di analisi delle componenti principali ad un gruppo comune di dati identificando due principali schemi di scarica che spiegavano la maggior parte della varianza. Una componente caratterizzava l'attività legata al movimento del nucleo cuneato esterno e dei neuroni corticali cerebellari, mentre l'altra rifletteva l'attività neuronale del nucleo interposito. Entrambe le componenti principali erano legate alla cinematica globale dell'arto ma, mentre la maggior parte della varianza dell'attività delle cellule del cuneato esterno e delle cellule del Purkinje veniva spiegata dall'orientamento dell'asse dell'arto, la scarica dei neuroni dell'interposito si relazionava meglio alle variazioni di lunghezza dell'arto. Attraverso l'analisi di regressione multipla applicata ai dati del vettore velocità si è dimostrato che l'attività delle cellule del Purkinje e dei neuroni del cuneato risultava maggiormente collegata alla componente direzionale del vettore velocità ed all'intero vettore, mentre la scarica dei neuroni del nucleo interposito presentava anche una significativa relazione con la componente scalare. Questa differenza nella rappresentazione della cinematica dell'arto osservata nel nucleo cuneato esterno e nella corteccia dello spinocerebello comparata con quella del nucleo interposito viene discussa in relazione al ruolo specifico che queste strutture potrebbero giocare anche durante il controllo attivo dei movimenti dell'arto. Nonostante ogni struttura mostri specifiche caratteristiche, nel complesso si mantiene un quadro funzionale in cui si delinea una rappresentazione globale dei parametri cinematici dell'arto sia nei neuroni precerebellari che in quelli cerebellari.

# INTRODUZIONE

## **Organizzazione morfo-funzionale del Cervelletto**

È noto ormai da tempo che il movimento degli arti nello spazio circostante è il risultato di una complessa integrazione di segnali discendenti e ascendenti che garantiscono movimenti precisi e funzionali. Numerosi studi elettrofisiologici hanno cercato di determinare quali fossero le strutture nervose coinvolte nel controllo del movimento degli arti. Una delle strutture maggiormente interessate da tali studi è stata sicuramente il cervelletto e i suoi collegamenti con la corteccia cerebrale da una parte e il midollo spinale dall'altra. È interessante notare che la sua organizzazione rispecchia le diverse funzioni a cui assolve. Esso riceve informazioni sugli scopi delle azioni motorie, sui comandi e sui segnali a feed-back associati alla programmazione e all'esecuzione dei movimenti. Inoltre mostra proiezioni efferenti verso i sistemi premotori e motori della corteccia cerebrale e del tronco dell'encefalo, e verso i sistemi che controllano direttamente gli interneuroni ed i motoneuroni spinali.

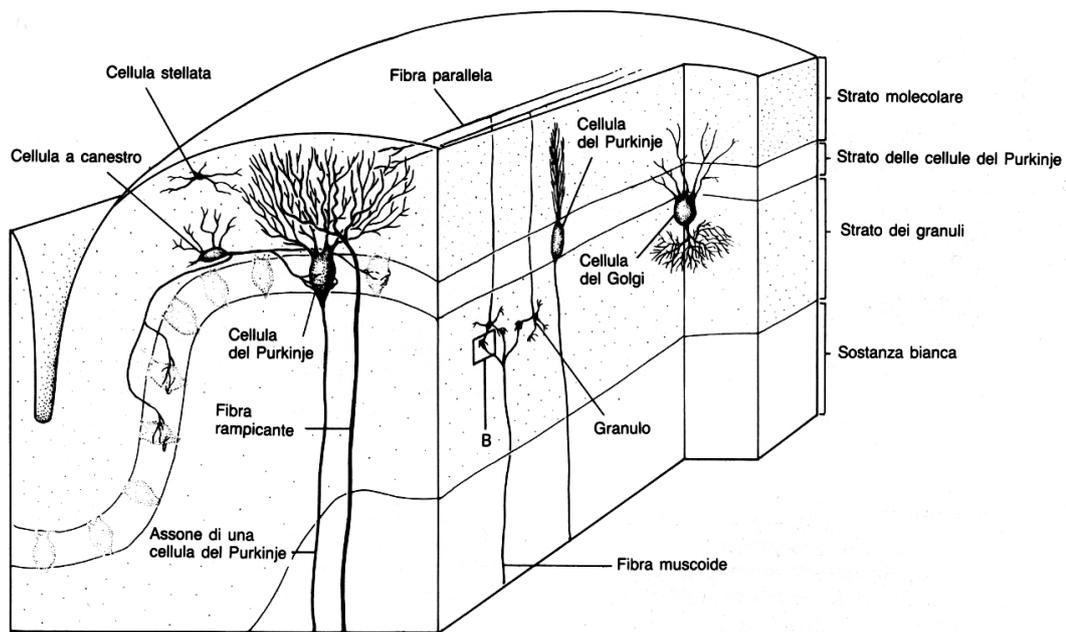
Da un punto di vista anatomico esso è costituito da un mantello esterno di sostanza grigia, la corteccia cerebellare, da sostanza bianca, nella parte più interna, e da 3 paia di nuclei profondi: il nucleo del fastigio, il nucleo interposito (globoso e emboliforme) e nucleo dentato. È da notare che la quasi totalità delle efferenze cerebellari origina da tali nuclei, fa eccezione una piccola parte della corteccia, il lobo flocculo-nodulare, i cui neuroni proiettano direttamente ai nuclei vestibolari laterale e mediale del tronco dell'encefalo. È possibile suddividere la corteccia cerebellare in 3 lobi in base alle fessure trasversali che la caratterizzano, lobo anteriore e posteriore (corpo del cervelletto) e lobo flocculo-nodulare (Fig. 1). I tre lobi sono stati a loro volta suddivisi in numerosi lobuli, designati con un loro nome, anche se più recentemente si preferisce indicarli con numeri romani da uno a dieci.



**Figura 1.** Organizzazione anatomica del Cervelletto. **A.** Rapporti del Cervelletto con le parti adiacenti del nevrasso. **B.** Suddivisioni longitudinale (lobo anteriore, posteriore e flocculo-nodulare) e trasversale (Verme, zona intermedia e zona laterale).

È più importante però considerare la sua suddivisione dal punto di vista funzionale. La presenza di due solchi longitudinali delimita una zona centrale detta verme e due aree laterali, definite emisferi cerebellari, a loro volta suddivise in una regione mediale e una laterale. Tali regioni del cervelletto e il lobo flocculo-nodulare ricevono afferenze diverse e proiettano a parti diverse dei sistemi motori evidenziando in tal modo le loro distinzioni funzionali. Il lobo flocculo-nodulare è la parte filogeneticamente più antica del cervelletto, riceve proiezioni direttamente da fibre vestibolari primarie e proietta ai nuclei vestibolari laterali, si ritiene sia coinvolto nel controllo dell'equilibrio e nei movimenti oculari ed è perciò definito vestibolo-cerebello. Le altre parti sono ritenute essersi sviluppate filogeneticamente più tardi e sono deputate al controllo di funzioni più complesse. In particolare il verme, ricevendo afferenze visive, uditive e vestibolari, nonché somatosensitive dal capo e dalle regioni prossimali del corpo e proiettando, tramite il nucleo del fastigio, alle regioni della corteccia cerebrale e del tronco dell'encefalo, è deputato al controllo dei muscoli prossimali del corpo e degli arti e a regolare la postura, la locomozione e la direzione dello sguardo. La regione mediale degli emisferi invece ricevendo afferenze somatosensitive dagli arti e proiettando, tramite il nucleo interposito, ai sistemi corticospinale e rubrospinale controlla i muscoli distali degli arti e quelli delle dita. Essendo le uniche regioni che ricevono afferenze somatosensitive dal midollo spinale vengono denominati spino-cerebello. Infine la regione laterale degli emisferi viene denominata cerebro-cerebello dal momento che riceve esclusivamente afferenze dalla corteccia cerebrale e proietta, tramite il nucleo dentato, alle cortecce motoria, premotoria e prefrontale. Si ritiene che esso sia implicato nella pianificazione delle azioni complesse e nella loro ripetizione mentale, oltre che nella valutazione consapevole degli errori dei movimenti.

Da un punto di vista anatomico la corteccia del cervelletto è costituita da tre strati contenenti cinque diversi tipi di cellule diversamente distribuite all'interno degli strati (Fig. 2). Nello strato più esterno, o strato molecolare, troviamo i corpi cellulari di due tipi di interneuroni inibitori, le cellule stellate e le cellule a canestro, che sono situate fra gli assoni dei granuli, neuroni eccitatori, e i dendriti delle cellule del Purkinje, neuroni inibitori, i cui corpi cellulari sono disposti negli strati più profondi. Tali dendriti sono

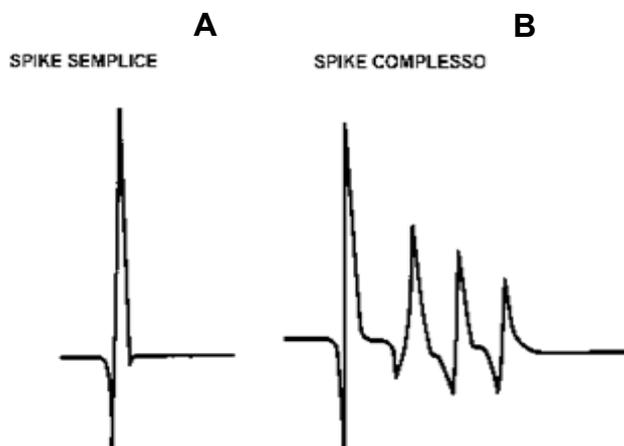


**Figura 2.** Suddivisione in strati della corteccia del Cervelletto. Organizzazione delle vie afferenti (fibre rampicanti e muscolari) e delle connessioni interne.

disposti perpendicolarmente agli assoni dei granuli che vengono denominati anche con il nome di fibre parallele. Sotto troviamo lo strato delle cellule del Purkinje in cui sono situati esclusivamente i corpi cellulari di tali neuroni. I loro assoni proiettano alla sostanza bianca sottostante e raggiungono i nuclei cerebellari profondi o i nuclei vestibolari costituendo l'uscita della corteccia cerebellare. Infine lo strato più interno prende il nome di strato dei granuli perché contiene un elevato numero di granuli oltre ad alcune cellule del Golgi, eccitatorie, e numerose fibre. L'elemento più caratteristico della corteccia cerebellare è la cellula del Purkinje, che rappresenta l'unico neurone corticale il cui assone lascia la corteccia per raggiungere le cellule dei neuroni cerebellari profondi. Tutte le altre cellule della corteccia, di fatto, si limitano a modulare direttamente o indirettamente, l'attività delle cellule del Purkinje. Una peculiarità della corteccia cerebellare è che la cellula dei granuli è l'unica cellula di natura eccitatoria (il neurotrasmettitore è l'acido glutammico), mentre tutte le altre cellule hanno azione inibitoria ed utilizzano come neurotrasmettitore l'acido  $\gamma$ -ammino-butirico (GABA). I due interneuroni inibitori dello strato molecolare esercitano la loro azione inibitoria sulle cellule del Purkinje, mentre la cellula di Golgi inibisce le stesse cellule dei granuli.

## Organizzazione delle afferenze al cervelletto.

Alla corteccia cerebellare arrivano due diversi tipi di fibre: le fibre rampicanti e le fibre muscoidi. Le prime prendono il nome dal fatto che vanno ad arrampicarsi sui dendriti delle cellule del Purkinje, eccitandole, mentre le fibre muscoidi stabiliscono un caratteristico rapporto sinaptico eccitatorio, detto glomerulo, con le cellule dei granuli. Queste ultime a loro volta, emettono un assone che dallo strato più profondo sale verso quello più esterno dove si biforca formando le fibre parallele. Queste fibre prendono rapporto sinaptico con i dendriti delle cellule del Purkinje, delle cellule del Golgi, delle cellule a canestro e delle cellule stellate, eccitandole. Una cellula del Purkinje viene innervata da una sola fibra rampicante e da decine di migliaia di fibre parallele. Elettrofisiologicamente la cellula del Purkinje presenta una peculiarità: quando viene eccitata dalle fibre muscoidi, genera piccoli potenziali post-sinaptici eccitatori capaci di generare, attraverso il fenomeno della sommazione spaziale e/o temporale, un potenziale d'azione detto spike semplice (Fig. 3A). Quando invece, la cellula del



**Figura 3.** Risposte caratteristiche delle cellule del Purkinje.

**A.** Potenziale d'azione semplice evocato dall'attività delle fibre muscoidi

**B.** Potenziale d'azione complesso evocato dall'attività delle fibre rampicanti.

Purkinje viene eccitata dalla fibra rampicante, genera uno spike detto complesso (Fig. 3B). Le fibre rampicanti traggono origine dall'oliva inferiore, in particolare dal nucleo olivare accessorio mediale e proiettano verso il nucleo interposito e l'area intermedia dello spino-cerebello.

Le fibre muscolari di origine dai neuroni spinali, ricevono una grande varietà di informazioni da recettori periferici quali i fusi neuro-muscolari, gli organi tendinei del Golgi, i diversi tipi di recettori cutanei e i recettori presenti nelle capsule articolari (Kuno et al., 1973).

Nel complesso, il sistema di proiezione spino-cerebellare viene suddiviso classicamente in quattro fasci principali, due per il trasporto di informazioni sensoriali provenienti dall'arto anteriore (fascio cuneocerebellare e fascio spinocerebellare rostrale) e due per le informazioni provenienti dall'arto posteriore. Il fascio cuneocerebellare si origina dal nucleo cuneato esterno, e riceve fibre afferenti che provengono dal collo, dall'arto anteriore e dalla parte superiore del tronco, terminando a livello del lobulo V del lobo anteriore, e nel lobulo paramediano del lobo posteriore del cervelletto. Il fascio spinocerebellare rostrale si origina dai neuroni delle lamine intermedie dei segmenti cervico-toracici del midollo spinale. Termina anche questo, al livello del lobulo V e nel paramediano. Il fascio spinocerebellare ventrale si origina a livello dei segmenti lombosacrali e ascende in parte ipsilateralmente, in parte controlateralmente fino al bulbo ed al ponte. Raggiunge il cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare superiore e termina principalmente nelle porzioni più anteriori del verme. Il fascio spinocerebellare dorsale si origina dalle cellule delle colonne di Clarke situate a livello della lamina 7 di Rexed. Gli assoni di questo fascio, attraverso il corpo restiforme, penetrano nel cervelletto terminando a livello delle "regioni spinali", cioè nel lobo anteriore (verme e zona intermedia) e posteriormente nella piramide e nel paramediano. Tradizionalmente, la funzione attribuita ai fasci spinocerebellari ventrale e rostrale è quella di integrare, la copia efferente del comando motorio con l'input sensoriale determinato dal comando stesso (Arshavsky, 1978). I fasci cuneocerebellare e spinocerebellare dorsale venivano invece considerati stazioni di relay precerebellari per le informazioni propriocettive e cutanee. Gli studi di Bosco e Poppele (2001) sul tratto spino-cerebellare dorsale, hanno fornito in questi ultimi dieci anni, una visione nuova sulla cui base questo fascio può essere considerato in grado, di trasferire al cervelletto informazioni basate su più input sensoriali, piuttosto che rimandare una copia dei segnali provenienti dai singoli recettori periferici.

In tal modo la via spino-cerebellare, dal punto di vista funzionale è in grado di rilevare differenti parametri anche su micromovimenti del muscolo, quali direzione, velocità, accelerazione e ampiezza. Queste vie forniscono al cervelletto diverse versioni delle informazioni relative alle variazioni che hanno luogo nell'organismo e nell'ambiente esterno e permettono al cervelletto di operare un confronto fra queste informazioni. Su tali caratteristiche si svolge l'attività di modulazione del cervelletto. È da notare che la quantità di collegamenti afferenti al cervelletto dal sistema propriocettivo e somatosensoriale è indice di quanto la perfetta conoscenza dello stato dell'apparato locomotore e degli organi esteroceettivi cutanei sia importante per l'attività integrativa del cervelletto.

## SCOPO DELLA TESI

Studi clinici ed elettrofisiologici su vari animali indicano che la zona intermedia della corteccia cerebellare e il nucleo interposito ad essa collegato sono coinvolti nel processare i segnali sensoriali preposti al controllo del movimento (Armstrong and Edgley, 1988; Ekerot et al., 1997; Thach and Bastian, 2004).

Numerose vie afferenti dagli arti raggiungono sia la corteccia cerebellare che il nucleo interposito. Considerazioni recenti attribuiscono a questi neuroni un ruolo peculiare nel processo d'integrazione. Studi elettrofisiologici sui neuroni del tratto spinocerebellare dorsale e su quelli del nucleo cuneato esterno di animali anestetizzati hanno dimostrato, per esempio, che queste strutture attuano un'ampia integrazione dei segnali afferenti per elaborare rappresentazioni globali dei parametri degli arti (Giaquinta et al., 1999; Martin et al., 2000; Bosco and Poppele, 2001; Garifoli et al., 2002).

Similarmente ai neuroni precerebellari, le cellule del Purkinje spino-cerebellari e le cellule del nucleo interposito sono quelle che meglio rispondono ai parametri cinematici dell'intero arto quali la posizione, la direzione di movimento e la velocità (van Kan et al., 1993a; Bosco et al., 2000; Valle et al., 2000; Casabona et al., 2003, 2004; Roitman et al., 2005; Valle et al., 2007).

Sebbene il nucleo cuneato esterno, le cellule del Purkinje spinocerebellari e il nucleo interposito siano stati oggetto di numerosi studi funzionali, sono pochi quelli che si sono concentrati sulle differenti modalità di scarica che caratterizzano queste strutture nelle stesse condizioni sperimentali, come ad esempio il movimento passivo degli arti. A questo proposito, Valle et al. (2000) hanno registrato da cellule del tratto spinocerebellare dorsale e da cellule del Purkinje in un gatto durante movimenti passivi degli arti che imitavano il ciclo del passo nella locomozione e hanno trovato che l'attività del tratto spinocerebellare dorsale è collegata a una combinazione di posizione dell'asse dell'arto e alla velocità di movimento, mentre le cellule del Purkinje codificavano la velocità dell'asse dell'arto e la posizione indipendentemente, suggerendo che il cervelletto potrebbe in qualche modo estrapolare le informazioni sulla

velocità da input precerebellari. Nella maggior parte dei casi, comunque, i dati sono focalizzati su singole strutture e la comparazione fra strutture in studi diversi è resa difficile dai differenti protocolli sperimentali e dalle analisi computazionali adottate in ciascun caso. In questa tesi, cercheremo di concentrarci su questi temi comparando le attività neuronali registrate nelle stesse condizioni sperimentali. Per far ciò, abbiamo registrato la scarica delle cellule del cuneato esterno, delle cellule del Purkinje della corteccia spinocerebellare e dei neuroni del nucleo interposito durante movimenti passivi circolari nelle stesse condizioni sperimentali. Abbiamo quindi utilizzato la tecnica delle componenti principali per estrapolare i patterns principali della scarica della popolazione neuronale in maniera da evidenziare sia le modalità comuni che quelle differenti tra i tre diversi siti di registrazione. In aggiunta, per approfondire le possibili trasformazioni sensoriali che possono avvenire nelle reti neuronali precerebellari, cortico-cerebellari e nucleari, abbiamo valutato le relazioni fra le singole componenti principali e i parametri cinematici dell'arto espressi come coordinate angolari delle articolazioni o coordinate polari della lunghezza degli assi degli arti e del loro orientamento. Infine, l'analisi cinematica è stata completata, analizzando la codifica delle componenti del vettore velocità (direzione e valore scalare) tra le tre strutture.

## **MATERIALI E METODI**

### **Preparazione dell'animale**

Le indagini sperimentali sono state condotte in vivo su 61 ratti maschi adulti appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (200-350 g). I ratti venivano anestetizzati con uretano (1.2 g/kg) somministrato per via intra-peritoneale. Qualora necessario venivano somministrate dosi aggiuntive di anestetico per via intramuscolare nel corso dell'esperimento. Lo stato di anestesia profonda veniva confermato dall'assenza di riflesso da retrazione e dal monitoraggio del battito cardiaco. Venivano fatti tutti gli sforzi per minimizzare il numero degli animali da usare e le loro sofferenze. Gli esperimenti venivano effettuati in accordo con le direttive del Consiglio della Comunità Europea (86/609/EEC) ed erano stati approvati dal comitato etico locale.

Una volta anestetizzato, l'animale veniva adagiato su di una base riscaldata che manteneva la temperatura corporea a 37° e posizionato sull'apparecchio stereotassico (David Kopf, instruments, USA).

Successivamente veniva applicata un'incisione sulla cute lungo la sutura longitudinale delle teca cranica e quindi veniva praticato un foro che permettesse di posizionare l'elettrodo in corrispondenza delle coordinate corrispondenti alle varie strutture. Per ogni struttura le coordinate venivano determinate secondo l'atlante stereotassico di Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986). Le superfici tissutali esposte venivano ricoperte con una soluzione di agar al 3%, per minimizzare l'essiccamento del tessuto.

### **Registrazione e istologia**

Per la registrazione dell'attività extracellulare dei singoli neuroni delle strutture interessate venivano utilizzate micro pipette di vetro (impedenza: 4-8 M $\Omega$ ) riempite con una soluzione al 4% di Pontamina Sky Blue in KCl 1 M.

L'acquisizione e la registrazione dell'attività neuronale veniva ottenuta tramite il collegamento dell'elettrodo di registrazione ad una serie di dispositivi elettronici. L'attività elettrica dei neuroni presi in esame veniva filtrata con un filtro di banda 0.3-10 kHz ed era preamplificata mediante un sistema differenziale (GRASS INSTRUMENT, USA).

I segnali elettrici registrati venivano trasferiti ad un equalizzatore (YAMAHA EQ 70, JPN) in grado di diminuire il rumore di fondo rispetto al segnale e successivamente venivano inviati ad un circuito interfacciato con un PC (1401-Plus, CED, UK) per la loro conversione analogico digitale e la relativa visualizzazione.

La presenza di occasionali spike complessi riconosciuti per la durata maggiore rispetto a quelli semplici, serviva per l'identificazione dell'attività delle cellule del Purkinje (van Kan et al., 1993b).

Al termine della registrazione, per facilitare la ricostruzione istologica, si marcava il punto di fine penetrazione mediante depositi iontoforetici di pontamina rilasciata con corrente negativa (20  $\mu$ A per 20 min).

Alla fine degli esperimenti l'animale veniva sacrificato e si procedeva, quindi, all'espianto dell'encefalo che veniva posto in formaldeide al 10% per 48 ore e successivamente in una soluzione di saccarosio al 30% per 24 ore. Si procedeva all'allestimento di preparati istologici di sezioni frontali dell'encefalo dello spessore di 60  $\mu$ m, mediante l'utilizzo del microtomo a congelamento. Tali preparati venivano montati su vetrini gelatinati, colorati con rosso neutro ed infine osservati al microscopio ottico. Questo permetteva di individuare il punto di fine penetrazione e quindi di ricostruire l'esatta localizzazione topografica dei neuroni studiati.

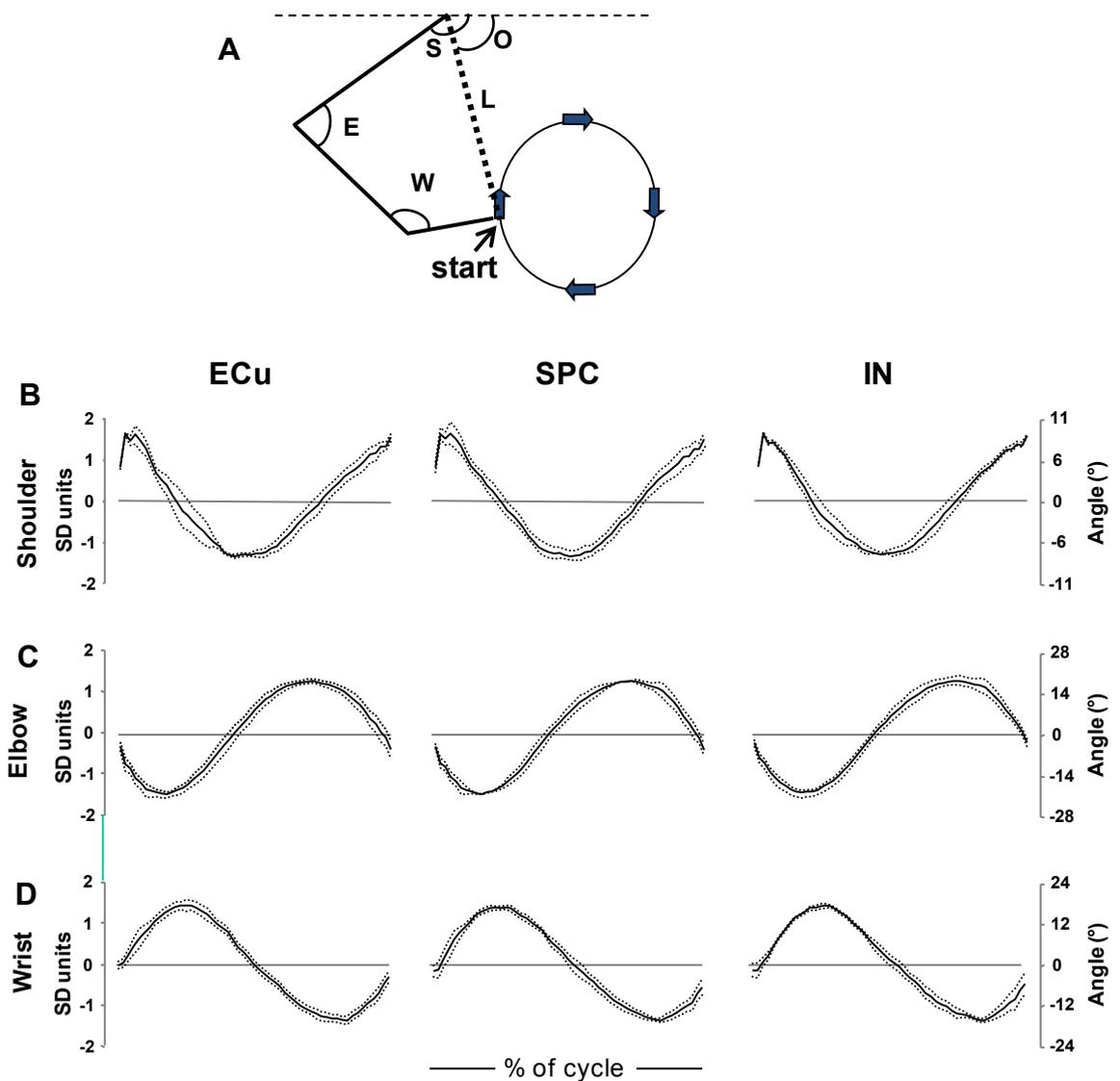
Per tenere conto delle differenze individuali nella grandezza dei cervelli dei ratti, abbiamo prima confrontato la morfologia delle sezioni istologiche con le sezioni corrispondenti nell'atlante di Paxinos e Watson (1986) e quindi usato un algoritmo descritto in Bosco et al. (2000) per normalizzare le dimensioni di ogni sezione di ratto a quelle dell'atlante. Per ogni struttura, abbiamo registrato all'interno delle seguenti coordinate: cellule del nucleo cuneato esterno, posteriore 2.6-4.0 e laterale 1.6-2.8; cellule del Purkinje spino-cerebellare del lobo anteriore, posteriore 1.04-2.06 e laterale

0.5-2.8, del lobo posteriore, posteriore 3.3-4.3 e laterale 1.4-4.0; cellule del nucleo interposito, posteriore 1.8-2.6 e laterale 1.6-3.5 (Paxinos e Watson, 1986).

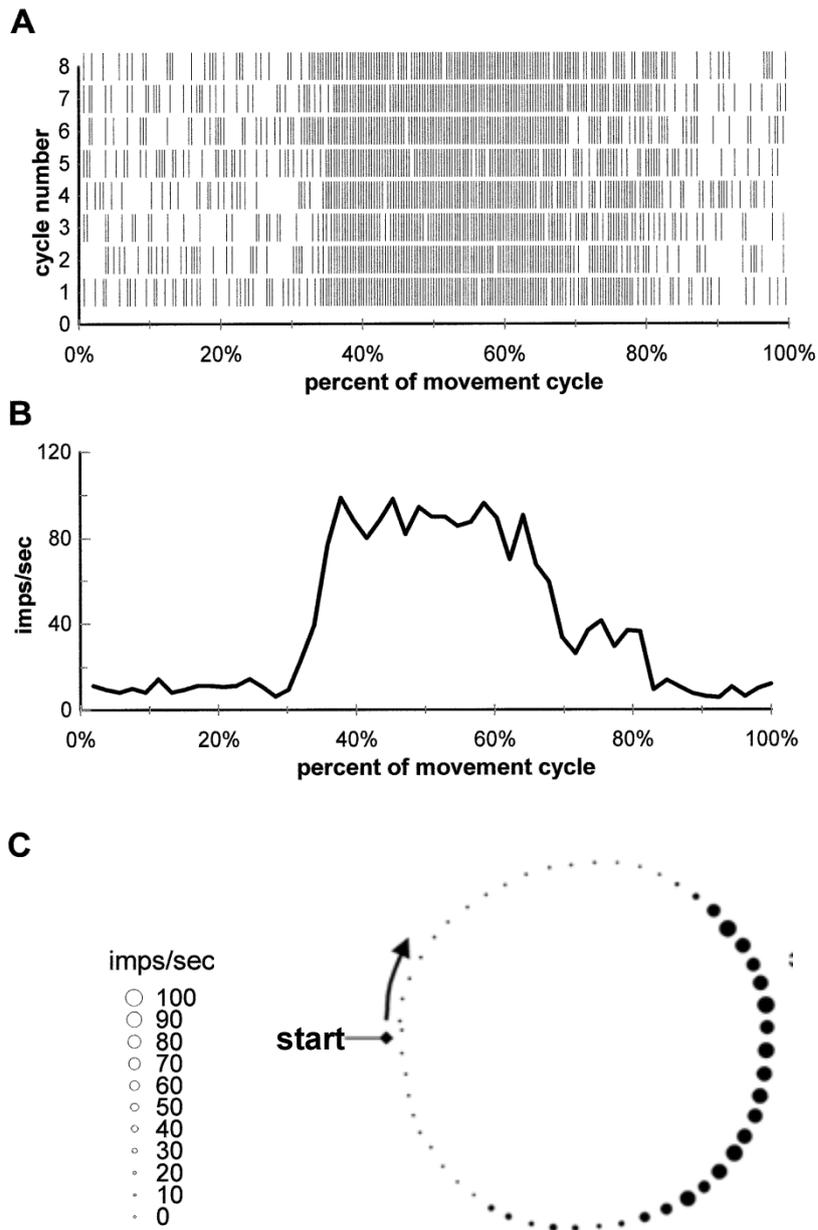
### **Movimenti passivi dell'arto anteriore**

Gli esperimenti venivano condotti posizionando, tramite un nastro di velcro, l'arto anteriore del ratto anestetizzato all'estremità di un braccio robotico controllato dal computer, che muoveva passivamente la zampa nel piano parasagittale lungo traiettorie circolari. La zampa percorreva la traiettoria con un movimento orario (raggio 1.5 cm, lunghezza circonferenza 9.5 cm; Fig. 4A) a due diverse velocità (0.4 o 0.6 cm/s). La cinematica degli arti veniva registrata per mezzo di quattro piccoli emettitori di ultrasuoni posizionati a livello di punti di riferimento anatomici: spalla, gomito, polso e articolazione metatarso-falangea (Fig. 4A). I segnali ad ultrasuoni venivano campionati a 200 Hz e con una risoluzione spaziale di 0.2 mm (CMS10 Zebris, Isny, Germany). Dalla localizzazione dei marcatori sulla pelle venivano estrapolati le traiettorie degli angoli della spalla (Fig. 4 B), del gomito (Fig. 4 C) e del polso (Fig. 4 D) misurando gli angoli tra due segmenti adiacenti dell'arto, eccetto l'angolo della spalla che è stato misurato rispetto all'orizzontale. Abbiamo inoltre definito le posizioni finali usando le coordinate polari intrinseche della lunghezza e dell'orientamento degli assi dell'arto definite come segmenti che collegano l'articolazione della spalla alla zampa anteriore (Fig. 4A). I dati cinematici per tutte le traiettorie venivano quindi ricampionati ad un numero fisso di punti (24) per poterli comparare agli istogrammi di attività.

Per scopi analitici, le registrazioni neuronali venivano allineate off-line rispetto al punto di partenza del percorso della zampa indicato dalla freccia nelle figure 4A e 5C. Gli istogrammi dell'attività media (Fig. 5B e C) erano calcolati dalle risposte di 8 cicli di movimento consecutivi (Fig. 5A; durata dell'intervallo di campionamento 196 ms). Infine gli istogrammi ottenuti venivano ricampionati usando un numero fisso di intervalli (24) per comparare direttamente le traiettorie circolari a differente velocità e per dare uguale peso alle diverse traiettorie nelle successive analisi.



**Figura 4.** Cinematica dell'arto anteriore del ratto. (A) Diagramma a linee dell'arto anteriore del ratto con la definizione degli angoli articolari, Lunghezza (L) e Orientamento (O) e la traiettoria circolare della zampa anteriore del ratto. (B-D) Grafici delle traiettorie angolari di Spalla (S), Gomito (E) e Polso (W) ottenute durante esperimenti che prevedevano la registrazione nel nucleo cuneato esterno, nelle cellule del Purkinje spinocerebellari e nel nucleo interposito. Gli angoli articolari vengono espressi in gradi e medie tra gli animali (tracce nere spesse). La variabilità tra gli animali viene indicata dall'intervallo di deviazione standard delimitato dalle strisce grigie.



**Figura 5.** (A) Il diagramma raster illustra gli spike semplici di una cellula del Purkinje che avvengono durante una serie di otto cicli di movimento, allineati rispetto al punto di partenza della traiettoria. La scala del tempo è espressa come frazione della lunghezza del ciclo di movimento. (B) Istogrammi di attività derivati dalle registrazioni cellulari. (C) Lo stesso istogramma di attività di B mostrato rispetto alle coordinate spaziali dell'arto anteriore durante il ciclo di movimento. La direzione antioraria della traiettoria di movimento viene indicata dalla freccia curva. La dimensione dei cerchietti neri pieni è proporzionale al livello di attività neuronale.

## **Analisi dell'attività neuronale**

In questo studio abbiamo analizzato l'attività di 467 cellule del Purkinje spino-cerebellari, 208 unità per il nucleo cuneato esterno e 108 unità per il nucleo interposto. Per determinare se ogni cellula venisse significativamente modulata lungo il movimento ciclico, abbiamo applicato il Wald-Wolfowitz runs test ( $P < 0.05$ ).

Abbiamo usato la tecnica delle componenti principali per quantificare il grado di somiglianza (o eterogeneità) nelle risposte modulate dal movimento passivo e registrate nei tre diversi siti neuronali. Tale tecnica veniva dapprima applicata ai dati relativi alle singole strutture e in seguito a un gruppo di dati comuni che includeva l'intero set dei neuroni modulati.

Per mezzo di questa analisi abbiamo estratto dal complesso delle onde di risposta un numero ridotto di onde non correlate tra loro che rappresentavano gli schemi d'onda più comuni nella popolazione e che includevano la maggior parte della varianza dei dati originari. Le singole forme d'onda relative a ciascuna attività, possono quindi essere ricostruiti dalla somma lineare di tutte le funzioni di base associate a coefficienti (weighting coefficients) che descrivono la loro relazione con gli istogrammi originari. Questi coefficienti rappresentano il grado di correlazione tra gli elementi originali del complesso dei dati e ogni singola componente delle componenti principali, variando fra -1 e 1. Per esempio, i coefficienti, sia di valore -1 che 1, indicano che gli istogrammi di attività sono identici o speculari alla componente principale, mentre un coefficiente pari a zero indica che l'istogramma di attività e la componente principale non sono correlati. Per semplificare l'interpretazione delle onde delle componenti principali e la loro relazione con le risposte in ogni sito di registrazione, abbiamo applicato la rotazione varimax, una rotazione ortogonale delle componenti principali per ottenere la massima separazione nella distribuzione dei vettori di risposta nello spazio delle componenti principali. In questo modo ogni vettore di risposta sarà rappresentato da una singola componente principale piuttosto che da una combinazione di due o più onde, evidenziando un maggiore raggruppamento dei vettori di risposta lungo gli assi delle componenti principali. L'approccio della rotazione varimax si adattava meglio al nostro

scopo poiché permetteva di studiare le potenziali differenze (o similarità) tra le risposte registrate dalle tre strutture nervose (vedi Glaser and Ruchkin, 1976; Kleinbaum et al., 1988, per maggiori informazioni sulla tecnica delle componenti principali).

Per estrarre un singolo set di componenti principali comuni alle tre strutture nervose, abbiamo creato un'insieme di onde di risposta che comprendesse un numero uguale di onde per ogni sito di registrazione (43, per un totale di 129 unità). Per il nucleo interposito questo numero corrisponde al numero totale dei neuroni responsivi, mentre per il nucleo cuneato esterno e per le cellule del Purkinje abbiamo estratto 43 unità in maniera casuale da entrambi i gruppi di dati di rispettivamente 103 e 165 unità. Per verificare che i sottogruppi creati casualmente delle cellule del Purkinje e del cuneato esterno fossero, in effetti, rappresentativi dell'intera popolazione abbiamo eseguito una analisi "bootstrap". In sintesi, abbiamo comparato le onde delle componenti principali estratte da 4 sottogruppi indipendenti di 43 cellule del Purkinje selezionati casualmente, usando la tecnica della correlazione lineare e abbiamo verificato che esse fossero indistinguibili (prima componente principale:  $r$  media 0.99, seconda componente;  $r$  media 0.94). Un risultato analogo veniva ottenuto per la popolazione neuronale del nucleo cuneato esterno, estraendo due sottogruppi casuali di 43 unità e comparando le onde delle componenti principali estratte da essi (prima componente principale:  $r$  media 0.99; seconda componente:  $r$  media 0.92).

Basandoci su questi risultati eravamo sicuri che le onde delle componenti principali estratte dai sottogruppi di cellule del Purkinje del cuneato esterno fossero rappresentative dell'intera popolazione. Infine abbiamo messo in relazione le componenti di risposta estratte tramite la tecnica delle componenti principali con la cinematica dell'arto utilizzando la regressione multipla lineare fra le prime tre componenti principali e gli angoli articolari (Eqn1) o i parametri della zampa (Eqn2).

$$PCn = \beta_0 + \beta_1 * S + \beta_2 * dS + \beta_3 * E + \beta_4 * dA + \beta_5 * W + \beta_6 * dW + \varepsilon \quad (1)$$

$$PCn = \beta_0 + \beta_1 * L + \beta_2 * O + \beta_3 * dL + \beta_4 * dO + \varepsilon \quad (2)$$

dove PC<sub>n</sub> indica il numero di ordine della componente principale; S, E e W rappresentano gli angoli articolari e dS, dE e dW sono le traiettorie delle velocità angolari; L e O rappresentano la posizione della zampa in coordinate dell'asse dell'arto e dL e dO le rispettive velocità;  $\beta_0$  rappresenta l'intercetta dei modelli e  $\beta_{1-6}$  sono i coefficienti di regressione; il termine  $\varepsilon$  rappresenta la varianza non spiegata dalla variabile dipendente e viene convenzionalmente definita "errore residuo".

A partire da questi modelli generali, abbiamo eseguito una procedura ad eliminazione progressiva dei termini non significativi (backward stepwise regression). Questo metodo elimina di volta in volta il parametro meno significativo del modello completo, finché rimangono solo le variabili significative. Abbiamo utilizzato una soglia di probabilità restrittiva ( $\alpha < 0.01$ ) per cui ogni variabile rimaneva nel modello se il valore di P dell'analisi della varianza era minore di 0.01.

L'analisi della direzione e della componente scalare del vettore velocità veniva realizzata tramite il seguente modello di regressione multipla lineare:

$$f = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 \sin \theta + \beta_4 \cos \theta + \beta_5 s + \varepsilon \quad (3)$$

dove  $f$  è la scarica neuronale;  $x$  e  $y$  rappresentano le coordinate cartesiane relative alla posizione della zampa lungo la traiettoria;  $\sin \theta$  e  $\cos \theta$  indicano la direzione del movimento passivo;  $s$  indica la *speed* cioè la componente scalare del vettore velocità (pressoché costante per ogni traiettoria);  $\beta_0$  rappresenta l'intercetta e  $\beta_{1-5}$  sono i coefficienti di regressione; il termine  $\varepsilon$  rappresenta l'errore residuo.

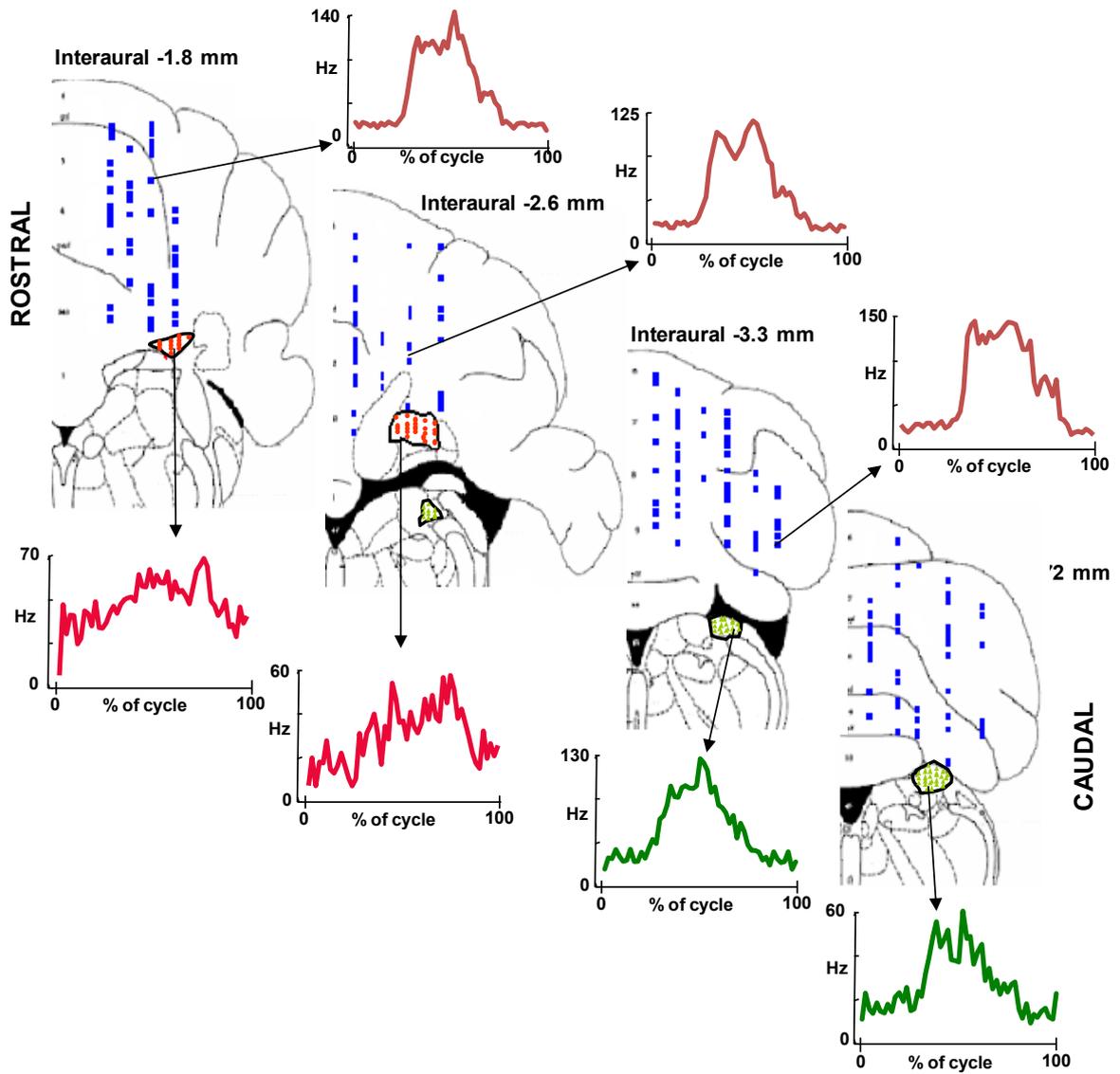
Tutte le analisi statistiche venivano eseguite utilizzando il pacchetto software SYSTAT 11 (Evanston, IL, USA).

## RISULTATI

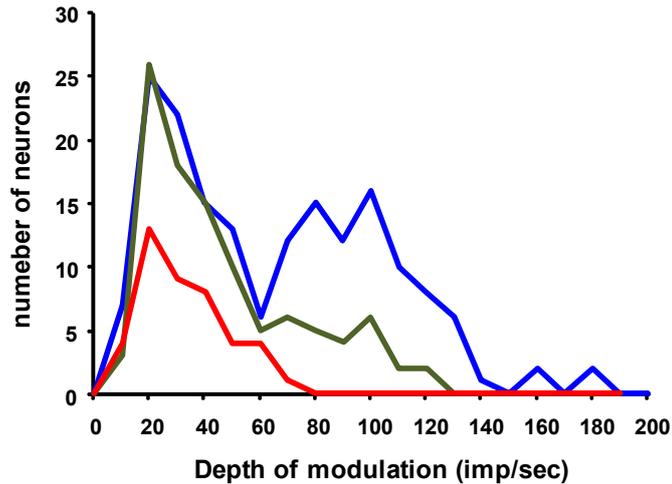
I movimenti della zampa lungo le traiettorie circolari venivano associati ai cambiamenti a carico degli angoli articolari senza riscontrare significative variazioni tra gli animali o tra le strutture studiate (vedi Fig. 4 B, C, e D). Di seguito vengono riportate le relazioni tra l'attività neuronale nelle tre strutture e la posizione, la velocità, la *speed* e la direzione della zampa durante il movimento circolare passivo

### Risposte neuronali

All'interno dell'intero gruppo di cellule (783 unità) registrate dal nucleo cuneato esterno (208), dalle cellule del Purkinje (467) e dal nucleo interposito (108) abbiamo trovato che l'attività di 311 neuroni (40%) veniva significativamente modulata dal movimento passivo dell'arto anteriore (Wald-Wolfowitz runs test,  $P < 0.05$ ). All'interno della popolazione di neuroni modulati 103 appartenevano al cuneato esterno, 165 alle cellule del Purkinje e 43 al nucleo interposito. Esempi delle risposte neuronali ai movimenti passivi dell'arto superiore registrati dalle tre strutture vengono illustrate nella figura 6. In generale, le risposte consistevano in un singolo picco di scarica che avveniva durante l'estensione dell'arto verso il basso seguita da un tasso di scarica sostanzialmente costante durante la restante parte del ciclo. Ciò avveniva in particolare per le risposte registrate dalle cellule del Purkinje e dal cuneato esterno, mentre un comportamento differente si evidenziava nelle risposte delle cellule del nucleo interposito, che consisteva in una più lenta crescita di attività durante l'estensione verso il basso dell'arto seguita da un ripido ritorno all'attività di base quando l'arto veniva tirato indietro. È da sottolineare che anche il livello di frequenza di modulazione dell'attività era distribuita in maniera differente fra le strutture (vedi Fig. 7). Infatti, mentre i neuroni del nucleo interposito mostravano una distribuzione unimodale nel range di frequenza di bassa attività di scarica (10-80 imp/s), le popolazioni neuronali del nucleo cuneato esterno e delle cellule del Purkinje esibivano profili bimodali con frequenza di modulazione i cui range variavano tra 10 e 60 imp/s e 60 e 120 imp/s.



**Figura 6.** Cellule del cuneato esterno, cellule del Purkinje spino-cerebellari e cellule dell'interposito modulate in maniera significativa durante i cicli del movimento mostrate su quattro sezioni coronali del cervello del ratto dall'atlante di Paxinos e Watson (1998). Triangolo verde: cellule del cuneato esterno; quadratino blu: cellule del Purkinje; triangolo rosso: neuroni dell'interposito. Le frecce nere indicano gli istogrammi di risposta di neuroni rappresentativi mentre la scala temporale viene espressa come frazione della lunghezza del ciclo.

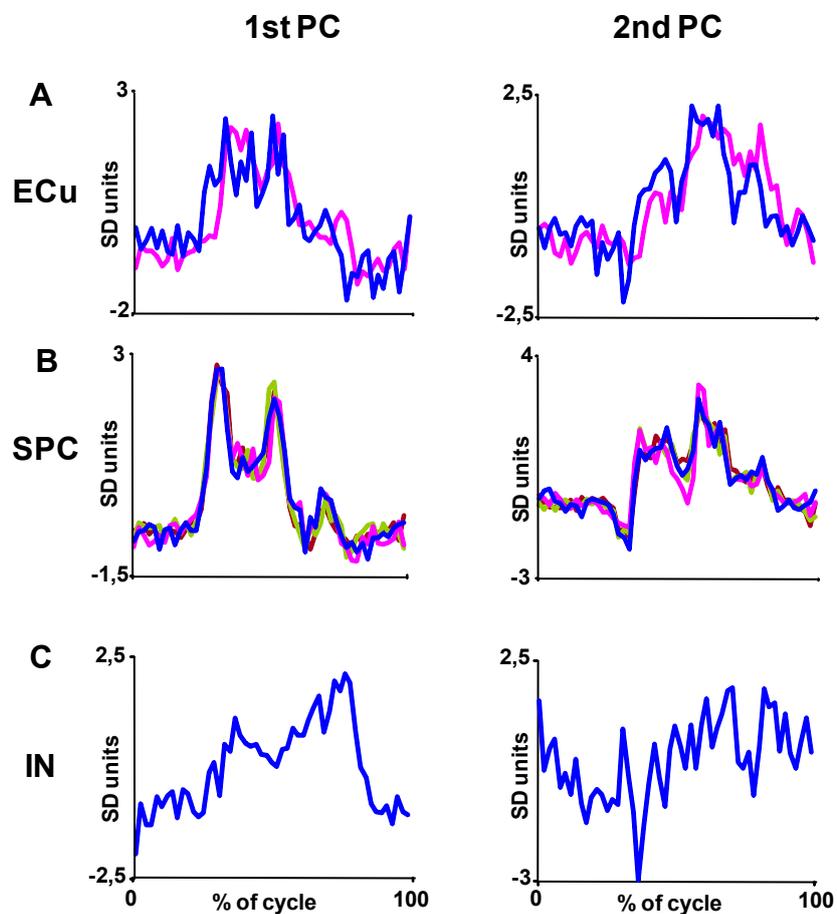


**Figura 7.** Distribuzione del livello di frequenza di modulazione per le cellule del cuneato esterno (linea verde), le cellule del Purkinje spino-cerebellari (linea blu) e le cellule dell'interposito (linea rossa). La modulazione di scarica viene espressa come incremento del livello di scarica rispetto al livello base.

## **Relazioni fra l'attività di scarica dei neuroni e posizione della zampa**

### *Analisi delle componenti principali*

Per quantificare meglio il grado di somiglianza (o eterogeneità) negli schemi di attività osservati nei tre siti di registrazione, abbiamo applicato l'analisi delle componenti principali, con la rotazione varimax, a un gruppo di dati costituito dalle risposte registrate da ogni sito e a un gruppo di dati comprendente risposte estratte da tutti e tre i siti di registrazione. Le prime due componenti principali estratte dalle cellule di ognuna delle tre strutture teneva conto del 68%, 75% e 45% della varianza totale rispettivamente del cuneato esterno, delle cellule del Purkinje e del nucleo interposito (Fig. 8). I grafici della figura 8 rappresentano le forme d'onda delle componenti principali calcolate da due sottogruppi di cellule del cuneato esterno e quattro sottogruppi delle cellule del Purkinje. Come descritto nella sezione relativa alle procedure sperimentali, le forme d'onda delle componenti principali estratte da questi sottogruppi di cellule erano rappresentative dell'intera popolazione. È da sottolineare che la forma della prima componente principale per queste due strutture richiama quella degli istogrammi d'attività delle risposte cellulari al movimento dell'arto anteriore con un picco durante l'estensione in basso seguito da una frequenza di scarica costante (vedere la parte destra della Fig. 8).



**Figura 8.** Le forme d'onda delle prime due componenti principali estratte dalla popolazione comune di cellule del nucleo cuneato esterno (ECu, A), delle cellule del Purkinje spino-cerebellari (SPCs, B) e del nucleo interposito (IN, C). Le componenti principali vengono mostrate in relazione alla frazione del ciclo del movimento. Le tracce sovrapposte in A e B corrispondono a sottocampioni scelti casualmente dalle cellule del cuneato esterno (due tracce) e dalle cellule del Purkinje spino-cerebellari (quattro tracce) rappresentative delle intere popolazioni.

Allo stesso modo, la forma della prima componente principale per la popolazione di cellule del nucleo interposito è molto simile all'attività dei neuroni caratterizzata da un picco ritardato all'inizio del movimento verso l'alto dell'arto (vedere parte sinistra della Fig. 8).

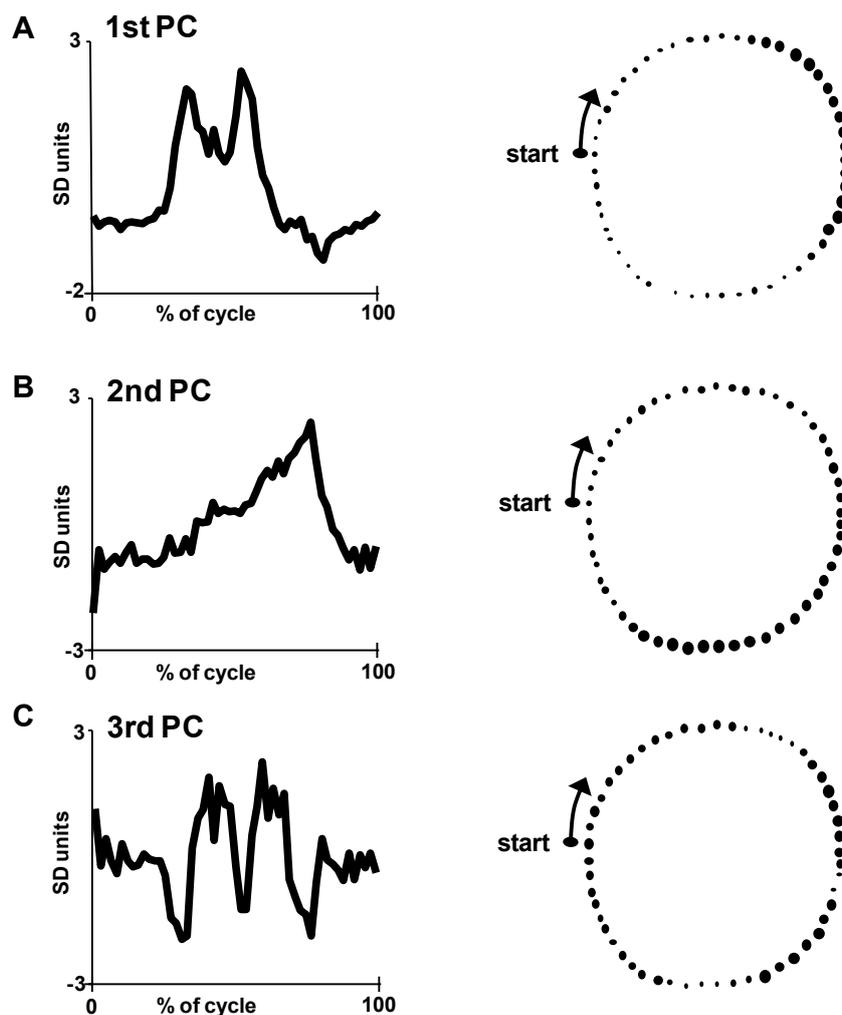
Le prime tre componenti principali estratte dal gruppo di dati comuni formato da 129 unità registrate dalle tre strutture teneva conto del 75% della varianza totale (Fig. 9). La forma d'onda della prima componente principale (Fig. 9A) che rappresentava il 43% della varianza del campione, richiamava l'andamento degli istogrammi di attività del nucleo cuneato esterno e delle cellule del Purkinje e evidenziava una forte correlazione con le prime componenti principali rappresentanti l'attività cellulare delle due strutture ( $r = 0.93$  per il cuneato e  $r = 0.91$  per le cellule del Purkinje; tabella 1). La seconda componente principale del gruppo comune

**Tabella 1.** Correlazioni fra le componenti principali dell'intero gruppo di dati e le componenti principali estratte dalle popolazioni di cellule delle singole strutture.

	ECu		SPC		IN	
	PC1 (51%)	PC2 (17%)	PC1 (41%)	PC2 (34%)	PC1 (40%)	PC2 (5%)
PC1	0.93	-0.09	0.91	0.21	0.17	-0.22
PC2	0.14	0.78	0.02	0.66	0.92	0.24

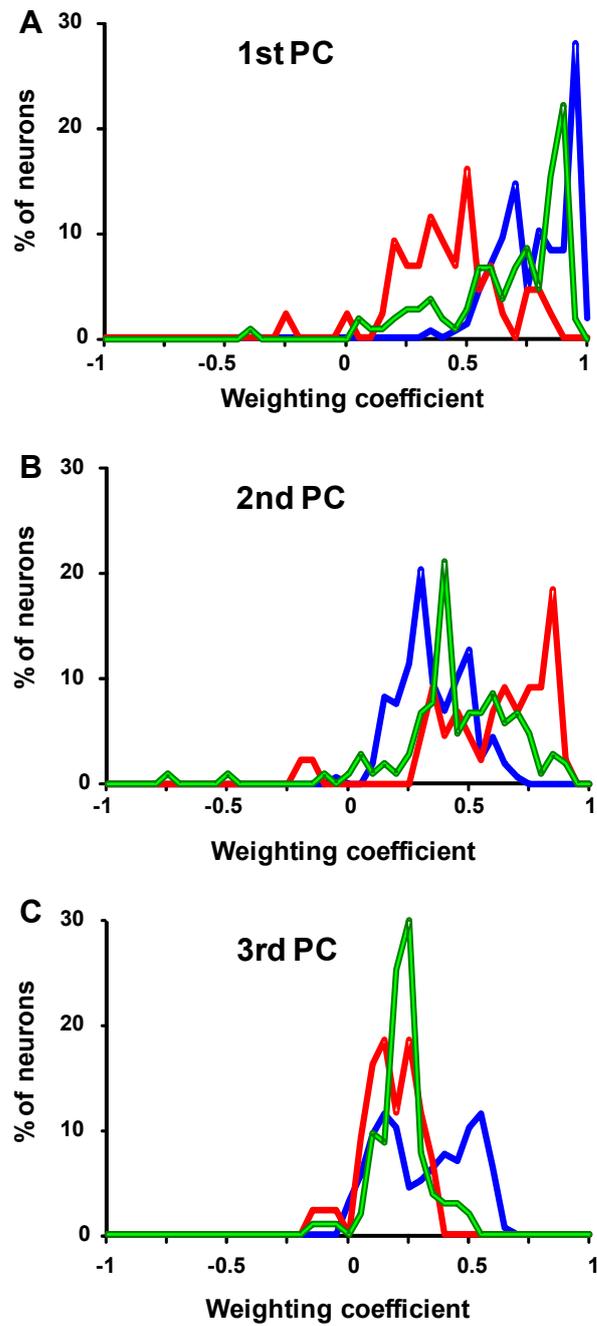
(Fig. 9B) teneva conto di una parte ancora abbastanza significativa della varianza (25%) e richiamava da vicino i profili di risposta osservati nel nucleo interposito. A dimostrazione di questo fatto, la forma d'onda di questa componente principale si correlava fortemente con la prima estratta dal gruppo di dati della struttura ( $r = 0.92$ ; tabella 1). La terza componente (Fig. 9C) spiegava solo il 7.1 % della varianza e rifletteva schemi di risposta bifasici. Componenti principali di ordine superiore spiegavano ognuna una frazione molto piccola della varianza (2.7%) e descrivevano oscillazioni ad alta frequenza dell'attività neurale, difficilmente distinguibile dal rumore.

Infine, abbiamo esaminato le distribuzioni dei weighting coefficients delle prime tre componenti principali per le unità appartenenti ai tre siti di registrazione (Fig. 10). Abbiamo trovato che le risposte registrate nel nucleo cuneato esterno (linea verde) e nelle cellule del Purkinje dello spinocervelletto (linea blu) avevano, in generale, forti correlazioni positive con la prima componente principale, poiché la distribuzione dei coefficienti si assestava in entrambi



**Figura 9.** Le forme d'onda della prima (A), della seconda (B) e della terza (C) componente principale estratte dall'intero gruppo comune di neuroni vengono mostrate rispetto alla frazione percentuale del ciclo del movimento (colonna di sinistra) e in relazione alle coordinate spaziali della zampa durante la traiettoria circolare (colonna di destra). Nella colonna di destra, la freccia ricurva indica la direzione del movimento circolare. La grandezza dei cerchietti neri è proporzionale al livello di attività neuronale.

i casi su 0.90 (Fig. 10A). Al contrario, essa si trovava sui 0.50 per le risposte del nucleo interposito (linea rossa), indicando una correlazione positiva ma relativamente debole con la forma d'onda delle prima componente principale. In effetti la distribuzione dei coefficienti della prima componente principale per le risposte del nucleo interposito risultava significativamente differente da quella delle risposte delle altre due strutture (Wilcoxon signed-rank test,  $P < 0.0001$ ).



**Figura 10.** Distribuzioni dei *weighting coefficients* delle forme d'onda della prima (A), seconda (B) e terza (C) componente principale per le risposte delle cellule del cuneato esterno (linea verde), delle cellule del Purkinje dello spinocervelletto (linea blu) e delle cellule dell'interposito (linea rossa).

Le risposte registrate nel nucleo interposito, invece, risultavano strettamente correlate alla forma d'onda della seconda componente principale; infatti la distribuzione dei coefficienti si attestava attorno a un valore di 0.90 (Fig. 10B). Questa distribuzione risultava anche significativamente differente da quelle delle risposte delle altre due strutture che raggiungevano valori di 0.40 e 0.30 rispettivamente per il cuneato esterno e per le cellule del Purkinje. Le distribuzioni dei coefficienti della terza componente principale indicavano, in media, scarse correlazioni per tutte e tre le strutture ed i valori erano centrati attorno a 0.25 (Fig. 10C). Dato che la forma d'onda della terza componente principale non contribuiva molto a spiegare gli schemi di risposta osservati fra le strutture, mentre le prime due venivano rappresentate in maniera consistente sia nel gruppo di dati comuni che nei gruppi separati dei tre siti di registrazione, abbiamo deciso di usare solo le prime due componenti principali estratte dal gruppo comune di dati per le ulteriori analisi quantitative.

### ***Analisi di regressione a variabili multiple***

Per indagare più approfonditamente il possibile significato funzionale del raggruppamento dei tipi di risposta correlati al movimento all'interno delle tre strutture, abbiamo messo in relazione ogni forma d'onda delle componenti principali del gruppo di dati comune ad alcuni parametri cinematici dell'arto anteriore. In particolare, abbiamo usato modelli di regressione multipla lineare per determinare le relazioni fra le forme d'onda delle prime due componenti principali e gli angoli articolari, la lunghezza e l'orientamento dell'arto (vedi sezione materiali e metodi). Una procedura di regressione ad eliminazione progressiva dei fattori applicata al modello basato sugli angoli articolari ha mostrato che le forme d'onda sia della prima che della seconda componente principale venivano ben predette dalle variabili di posizione e/o di velocità associate ad almeno due articolazioni (vedi parte inferiore tabella 2). La prima componente principale era correlata meglio alla posizione della spalla, alla velocità del gomito e alla posizione del polso ( $R^2 = 0.72$ ), mentre la seconda alla posizione e alla velocità di spalla e gomito ( $R^2 = 0.71$ ). I coefficienti di regressione standardizzati riportati nella tabella 2, indicano che il maggior contributo alla varianza della prima componente principale viene dalla posizione della spalla mentre la velocità del gomito era il maggior predittore della forma d'onda della seconda componente. La parte superiore della tabella 2 e la figura 11 riportano il risultato del modello di regressione ad eliminazione progressiva che includeva la lunghezza e

l'orientamento dell'asse dell'arto come predittori delle prime due componenti principali. La tabella mostra chiaramente che la prima componente principale si correlava meglio con l'orientamento dell'asse dell'arto e con la sua velocità ( $R^2 = 0.62$ ), mentre la seconda con la lunghezza dell'arto e la variazione della stessa nel tempo ( $R^2 = 0.70$ ). I coefficienti di regressione standardizzati (tabella 2) e i grafici rappresentati in figura 11 indicano che, per entrambe le componenti principali, i termini posizionali spiegano la maggior parte della varianza.

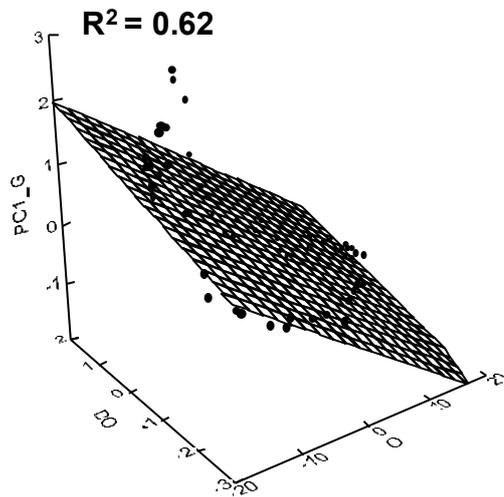
**Tabella 2.** Relazioni fra le forme d'onda delle componenti principali e i parametri cinematici.

Model	$R^2$	$\beta$ (L)	$\beta$ (O)	$\beta$ (dL)	$\beta$ (dO)
PC1	0.62		0.541		0.107
PC2	0.70	0.696		0.017	

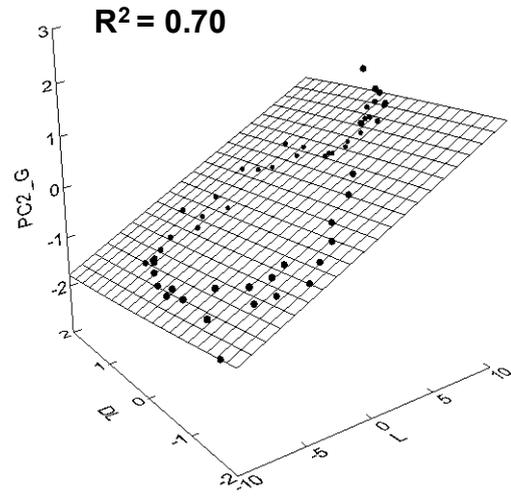
  

Model	$R^2$	$\beta$ (S)	$\beta$ (dS)	$\beta$ (E)	$\beta$ (dE)	$\beta$ (W)	$\beta$ (dW)
PC1	0.72	3.643			0.998	0.189	
PC2	0.71	0.730	0.183		1.411		

Risultati dell'analisi di regressione multipla. In alto, le forme d'onda delle componenti principali (PC1 e PC2) vengono predette dai parametri degli assi dell'arto (L, dL, O, dO). In basso, i parametri degli angoli articolari dell'arto (S, dS, spalla e velocità della spalla; E, dE, gomito e velocità del gomito; W, dW, polso e velocità del polso) come predittori delle forme d'onda delle componenti principali.  $R^2$  indica la frazione di varianza della forma d'onda spiegata dal modello. I coefficienti di regressione ( $\beta$ ) sono standardizzati.



$$PC1 = -0.0002 - 0.0728 * O + 0.2678 * dO$$



$$PC1 = -0.0001 + 0.1408 * L - 0.1840 * dL$$

**Figura 11.** Relazioni fra le prime due componenti principali del gruppo comune di dati e i parametri cinematici dell'arto anteriore. I grafici mostrano i risultati della regressione a variabili multiple in cui le due componenti vengono mostrate in relazione all'orientamento (O) e alla variazione dell'orientamento (dO) e alla lunghezza (L) e alla variazione della lunghezza (dL). Per ogni grafico, il modello di regressione rappresentato dalla superficie della griglia viene sovrapposto ai tassi di scarica osservati in un grafico a dispersione tridimensionale. I valori nelle equazioni in fondo ai grafici rappresentano i coefficienti di regressioni grezzi (non standardizzati).

## **Relazioni fra l'attività di scarica dei neuroni e la velocità del movimento**

### ***Risposte neuronali***

Nella figura 12 vengono illustrate alcune risposte tipiche di cellule del nucleo cuneato (Fig. 12A), della corteccia spinocerebellare (Fig. 12B) e del nucleo interposito (Fig. 12C) a differenti *speed* (le linee grigie rappresentano la *speed* più bassa: 0.4 cm/s; le linee nere rappresentano la *speed* più alta: 0.6 cm/s).

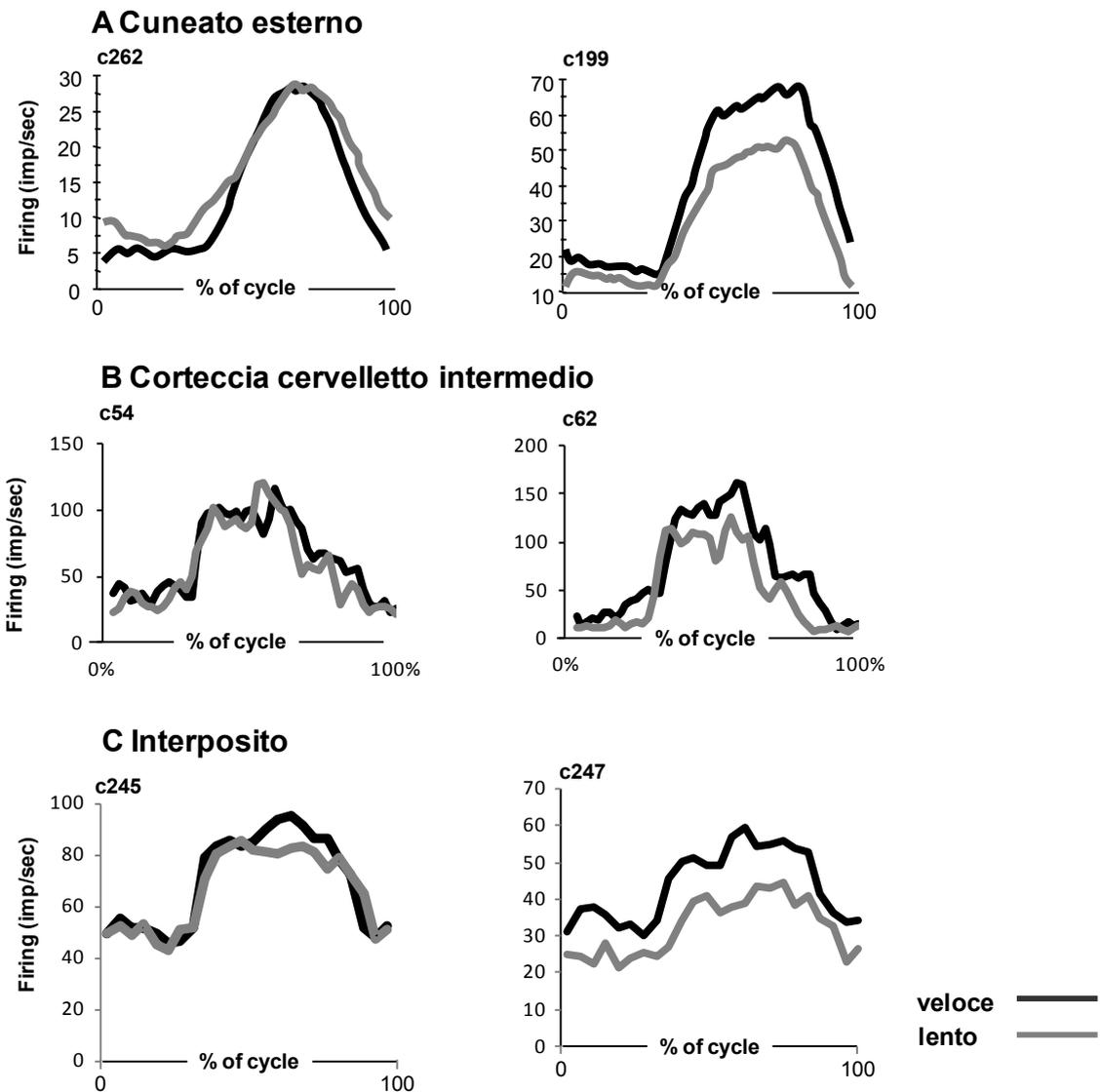
Lo schema di scarica della cellula 262 del cuneato, della cellula 54 dello spinocervelletto e della cellula 245 dell'interposito (colonna di plot a sinistra nella Fig. 12) rappresentano tipici esempi in cui l'attività di scarica viene ampiamente modulata dalla direzione dei movimenti. Tuttavia, questi neuroni non evidenziano cambiamenti significativi collegati alla *speed* del movimento, poiché le tracce sono quasi sovrapposte. Dal lato opposto, la cellula 199 del cuneato, la cellula 62 dello spinocervelletto e la cellula 247 dell'interposito (colonna di plot a destra nella Fig. 12) risultavano responsive sia alla direzione che alla *speed* del movimento passivo, cioè al vettore velocità nel suo complesso. Infatti, queste cellule mostrano lo stesso schema di risposta delle cellule descritte prima ma esibiscono una scarica neuronale accresciuta per i movimenti più rapidi.

I neuroni modulati dalla *speed* del movimento nella maggior parte dei casi crescevano le loro frequenze di scarica durante i movimenti più veloci (come quelli rappresentati nella Fig. 12), mentre una relazione inversa con la *speed* del movimento veniva osservata meno frequentemente.

### ***Analisi di regressione a variabili multiple***

Per quantificare le relazioni fra l'attività di scarica delle cellule e i dati relativi al vettore velocità del movimento, componente direzionale e scalare, è stato elaborato un modello di regressione lineare a variabili multiple in cui tali parametri cinematici venivano considerati come predittori dell'attività di scarica (vedi sezione materiali e metodi). Partendo dal modello iniziale, attraverso l'eliminazione progressiva dei predittori cinematici meno significativi, abbiamo identificato tre classi di neuroni che mostravano relazioni differenti tra gli schemi di scarica neuronale e i parametri cinematici del movimento. Un tipo di attività neuronale era

collegato al vettore velocità del movimento nel suo complesso (il modello di regressione includeva sia il termine *speed* che la direzione), il secondo tipo era collegato solo alla componente direzionale ( $\theta$ ) del vettore velocità, mentre il terzo tipo veniva modulato solo dalla componente scalare di velocità (*s*) del vettore.

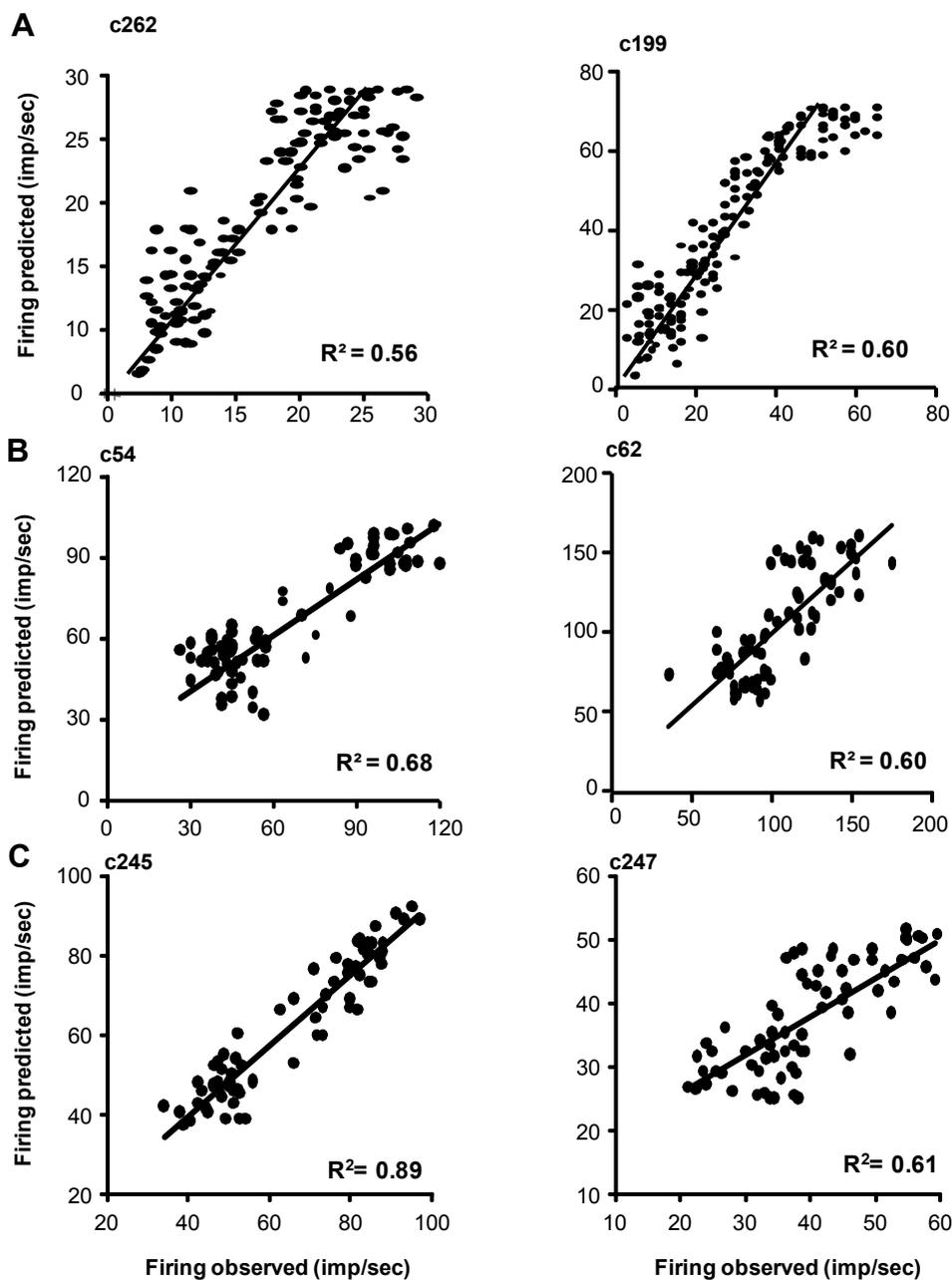


**Figura 12.** Gli istogrammi di attività mostrano la scarica neuronale durante i movimenti circolari ad alta (tracce nere) e bassa (tracce grigie) velocità. Gli istogrammi sono stati filtrati e sovrapposti per una migliore comparazione visiva. (A) Esempi di neuroni che mostrano modulazione alla direzione del movimento (cellula 262, 54 e 245) e sia alla direzione che alla *speed* (cellula 199, 62 e 247) nel nucleo cuneato esterno (A), tra le cellule del Purkinje della corteccia del cervelletto intermedio (B) e nel nucleo interposito (C). Tutti i dati sono normalizzati e la scala temporale viene espressa in termini di frazione della lunghezza del ciclo.

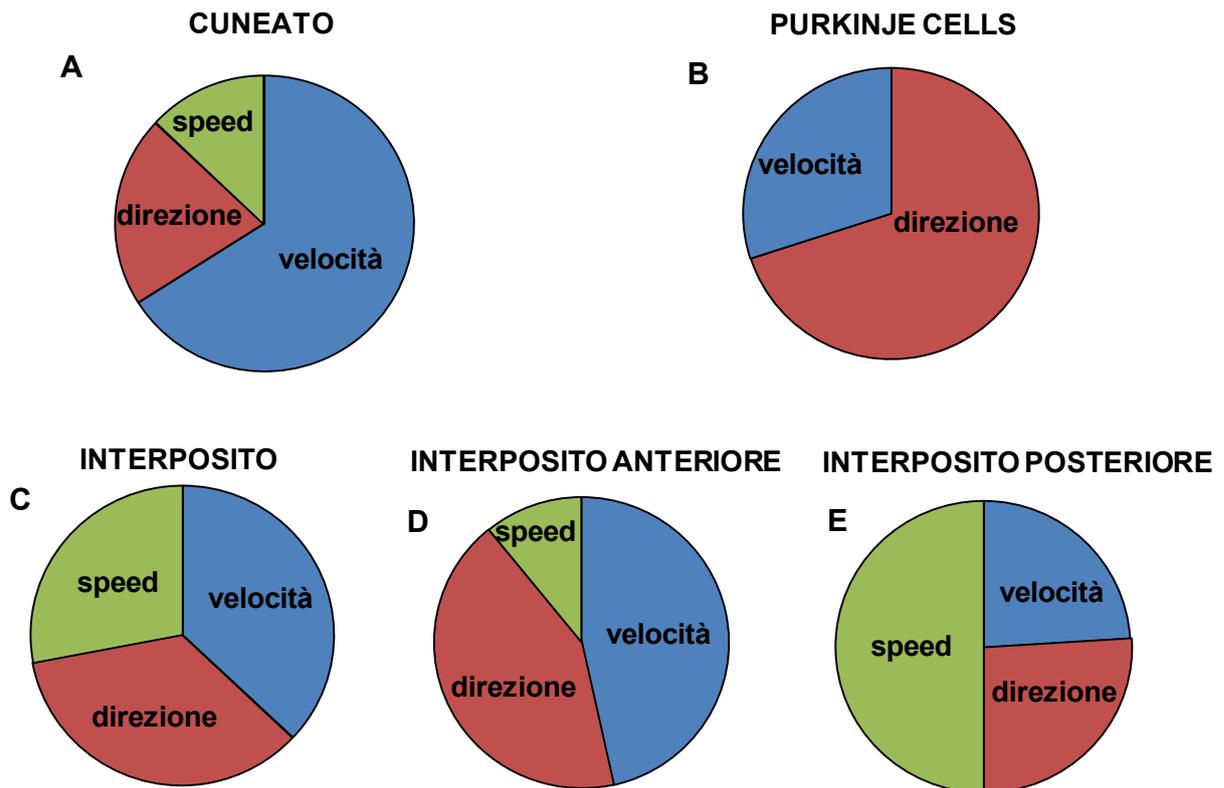
La posizione non veniva inclusa in questa fase, poiché, a causa delle costrizioni cinematiche della traiettoria circolare della zampa, la posizione e la direzione del movimento risultavano altamente correlate ( $r = 1$ ) facendo risultare un modello di regressione che le includesse entrambe non valido.

Nella figura 13 le frequenze di scarica osservate per le cellule mostrate in figura 12 vengono comparate alle frequenze di scarica predette dal modello di regressione. Nella colonna di plot a sinistra nella figura 13 sono rappresentate le cellule delle tre strutture il cui modello migliore per rappresentare i dati osservati includeva solo la componente direzione della velocità. Infatti, la varianza spiegata (espressa in termini di coefficiente di determinazione,  $R^2$ ) dalle cellule modulate dalla direzione era il 56% per il cuneato (pannello di sinistra della Fig. 13A; cellula 262), il 68% per la cellula del Purkinje (pannello di sinistra della Fig. 13B; cellula 54) e 89% per l'interposito (pannello di sinistra della Fig. 13C; cellula 245). Livelli simili di varianza erano spiegati anche dalle cellule la cui modulazione dipendeva dall'intero vettore velocità (colonna di plot a destra nella Fig. 13). In questo caso la varianza era il 60% per il cuneato (pannello di destra della Fig. 13A; cellula 199), il 60% per la cellula del Purkinje (pannello di destra della Fig. 13B; cellula 62) e il 61% per l'interposito (pannello di destra della Fig. 13C; cellula 247). I residui del modello erano, in generale, distribuiti in modo omogeneo suggerendo che la varianza residua fosse dovuta alla variabilità intrinseca della frequenza di scarica delle cellule.

Il riepilogo del conteggio del numero di neuroni modulati dal vettore velocità e dalle sue due componenti, per ogni struttura studiata, è riportato in figura 14. Nel cuneato (Fig. 14A) il 66% delle cellule si adattava ad un modello che comprendeva sia la *speed* che la direzione (cioè il vettore velocità nel suo complesso) come predittori. Frazioni minori del campione delle cellule responsive era associato alla direzione (21%) e alla *speed* (13%) da sole. Per quanto riguarda le cellule del Purkinje (Fig. 14B), la grande maggioranza dei neuroni (70%) veniva modulata esclusivamente dalla direzione dei movimenti passivi dell'arto e non risultava sensibile ai cambiamenti della *speed* del movimento. Al contrario, il rimanente 30% dei neuroni combinava le informazioni direzionali e quelle relative alla *speed* per rappresentare il vettore velocità del movimento.

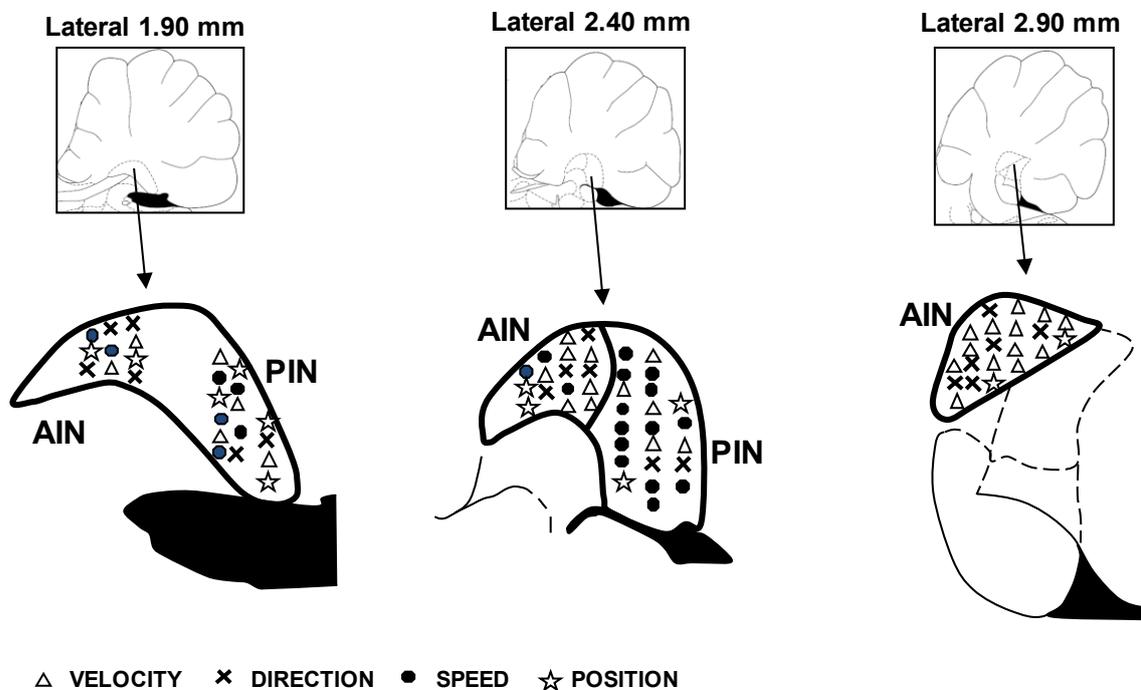


**Figura 13.** Risultato dell'analisi di regressione multipla applicata alle attività neuronali rappresentate nella figura 12. L'attività di scarica predetta dal modello di regressione viene messa a confronto con la scarica neuronale osservata nelle cellule modulate dalla direzione da sola (cellula 262, 54 e 245) o da una combinazione di velocità e *speed* (cellula 199, 62 e 247) nel nucleo cuneato esterno (A), tra le cellule del Purkinje della corteccia del cervelletto intermedio (B) e nel nucleo interposito (C). Per ogni regressione viene riportato il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ).



**Figura 14.** Grafici a torta che riepilogano i risultati dell'analisi di regressione multipla per i neuroni del cuneato esterno (A) per le cellule del Purkinje del cervelletto intermedio (B), per il nucleo interposito per intero (C), nell'interposito anteriore (D) e nell'interposito posteriore (E). Nei grafici le fette indicano le frazioni dei neuroni modulati dal vettore velocità nel suo complesso, dalla direzione da sola e dalla *speed* da sola.

Nel nucleo interposito il 35% dei neuroni veniva modulato dalla direzione del movimento, il 28% dalla *speed* e il 37% era sensibile all'intero vettore velocità (Fig. 14C). Nel caso dell'interposito è stato esaminato in che modo i neuroni che erano in relazione con i differenti aspetti della cinematica della zampa anteriore risultavano distribuiti tra la porzione anteriore e posteriore del nucleo. Nella porzione anteriore (Fig. 14D) i neuroni dipendenti dalla velocità e dalla direzione rappresentavano gran parte della popolazione (rispettivamente il 46% e il 43%), mentre la percentuale di unità legate alla *speed* era molto più ridotta (11%). Nella porzione posteriore dell'interposito (Fig. 14E) la metà dei neuroni che rispondevano al movimento venivano modulati dalla *speed* (50%) con un numero molto minore di unità legate al vettore velocità nel suo complesso (24%) o alla direzione (26%). La distribuzione topografica dei tre tipi di attività all'interno del nucleo interposito viene illustrata nella figura 15.



**Figura 15.** Collocazione all'interno del nucleo interposito dei neuroni responsivi ai movimenti passivi dell'arto mostrata su tre sezioni sagittali del cervelletto del ratto riprese dall'atlante di Paxinos e Watson (1998). I neuroni dell'interposito vengono marcati con simboli differenti in base a come la loro attività veniva modulata dai parametri cinematici: i *triangoli* indicano i neuroni modulati dal vettore velocità nel suo complesso mentre *croci* e *cerchietti neri* indicano, rispettivamente, neuroni modulati solo dalla direzione o dalla *speed*. AIN interposito anteriore, PIN interposito

## DISCUSSIONE

In questo studio sono state analizzate le relazioni fra le attività dei neuroni cerebellari e pre-cerebellari e la cinematica dei movimenti passivi dell'arto nel ratto.

L'analisi delle componenti principali ha permesso di identificare due principali schemi di scarica delle cellule rispetto alla posizione della zampa. La prima componente principale era associata a una rapida crescita dell'attività quando l'arto anteriore si trovava in avanti seguita da una riduzione di attività quando esso veniva a trovarsi nell'opposta direzione: questo comportamento era tipico per le cellule del Purkinje e per i neuroni del cuneato. La seconda componente principale veniva associata a una crescita più lenta dell'attività quando l'arto si disponeva anteriormente: in questo caso erano interessati principalmente i neuroni dell'interposito. Le due modalità di scarica si correlavano entrambe fortemente con la cinematica dell'estremità dell'arto, ma la maggior parte della varianza dell'attività del nucleo cuneato e delle cellule del Purkinje veniva spiegata dalla traiettoria e dalla velocità dell'orientamento dell'asse dell'arto mentre l'attività delle cellule del nucleo interposito si correlava meglio con la traiettoria e la velocità della lunghezza dell'arto.

Infine, l'analisi della regressione multipla ha permesso di rilevare una prevalenza della componente direzionale del vettore velocità in tutte le strutture mentre la componente scalare (*speed*) è presente in maniera significativa solo nel cuneato e nell'interposito.

### **Analisi delle componenti principali e rappresentazione dei parametri dell'arto**

Le analisi di regressione a variabili multiple indicano che le prime due forme d'onda delle componenti principali sono correlate meglio ai parametri globali dell'arto. Infatti, per entrambe, l'eliminazione progressiva dei fattori praticata a partire dal modello basato sui parametri degli angoli articolari dell'arto (vedi equazione 1), produce un modello finale che include variabili associate con almeno due articolazioni. In tal modo, la rappresentazione sensoriale del movimento nei differenti stadi del cervelletto combina le informazioni di posizione e/o di velocità da parti differenti dell'arto piuttosto che codificare variabili di una singola articolazione. Questa osservazione era supportata dall'ampia percentuale di varianza spiegata

dalle coordinate polari dell'estremità con la lunghezza come miglior predittore nella prima componente principale e l'orientamento dell'asse dell'arto nella seconda. Dal momento che le costrizioni meccaniche nel movimento passivo dell'arto danno luogo a una correlazione tra gli angoli articolari e i parametri legati agli assi dell'arto (Bosco et al., 1996), non possiamo separare in maniera chiara l'attività neuronale basata sugli angoli articolari o sui parametri degli assi dell'arto. Tuttavia, sia le evidenze mostrate in questo lavoro che le osservazioni prodotte da molti studi supportano l'idea che i circuiti cerebellari codificano informazioni dai movimenti dell'intero arto e che la lunghezza e l'orientamento dello stesso potrebbero essere una rappresentazione neuronale essenziale della cinematica dell'arto (Bosco et al., 1996; Valle et al., 2000; Bosco and Poppele, 2001; Poppele et al., 2002). Inoltre, le strutture pre-cerebellari, cerebellari e molte di quelle appartenenti al sistema nervoso centrale coinvolte nel controllo sensoriale-motorio codificano anche altri parametri cinematici come la velocità e la direzione (Johnson and Ebner, 2000; Valle et al., 2000; Bosco and Poppele, 2001; Casabona et al., 2003; Roitman et al., 2005; Mason et al., 2006). È da notare che in questa parte del lavoro la velocità e la direzione dei movimenti passivi potrebbero contribuire alla modulazione delle scariche cellulari. Infatti, in aggiunta al contributo principale dei termini posizionali, nel modello dell'asse dell'arto una frazione della varianza veniva spiegata dalla lunghezza e dalla velocità di spostamento dell'orientamento dell'asse. Rispetto alla direzione del movimento, sebbene in questo studio abbiamo usato solo movimenti in direzione oraria, sia la significatività dei termini indicanti variazione nel tempo che le deviazioni sistematiche mostrate nel modello di regressione previsto implicano un contributo della direzione del movimento sulle risposte neuronali per tutte le strutture studiate. Questo dato è confermato dai risultati della scomposizione delle componenti della velocità che hanno evidenziato un contributo significativo della componente direzionale sia nelle strutture pre-cerebellari che cerebellari.

### **Codifica pre-cerebellare e della corteccia cerebellare intermedia dei segnali sensoriali**

Nel presente studio, abbiamo registrato l'attività neuronale durante i movimenti passivi dell'arto e di conseguenza la modulazione dell'attività precerebellare e cerebellare che abbiamo osservato, dipenderà principalmente dagli input propriocettivi afferenti (specialmente quelli provenienti dai fusi muscolari) che raggiungono lo spinocervelletto attraverso il nucleo cuneato

esterno così come attraverso il tratto rostrale spino-cerebellare, le vie reticolo-cerebellari e olivo-cerebellari (Oscarsson, 1965; Santori et al., 1986; Jueptner et al., 1997; Bosco and Poppele, 2001). Le forti relazioni tra le scariche neuronali e la cinematica dell'intero arto, riportate sia per i neuroni precerebellari che cerebellari, implicano che i segnali afferenti siano sottoposti a un certa quantità di integrazione anche a livello dei neuroni sensoriali di secondo ordine, come precedentemente mostrato per i neuroni del tratto spinocerebellare dorsale (Bosco e Poppele, 2001).

Mettendo in relazione l'attività neuronale delle cellule del Purkinje e del nucleo cuneato con il vettore velocità del movimento si evidenziavano alcune differenze. In particolare, mentre le cellule del Purkinje risultavano responsive soprattutto alla componente direzionale del vettore velocità, le cellule del cuneato esterno rappresentavano meglio il vettore nel suo complesso. È da sottolineare, però, che anche all'interno del nucleo cuneato una quota rilevante (21%) dei neuroni responsivi alla velocità veniva modulata dalla sola direzione.

Bisogna considerare, comunque, che entrambe le strutture mostravano una generale scarsa sensibilità alla componente scalare della velocità (*speed*), così come è stato riportato per i neuroni del tratto spinocerebellare dorsale (Bosco e Poppele, 1999). Questa bassa sensibilità per la *speed* della scarica neuronale del tratto spinocerebellare dorsale è stata interpretata come una proprietà dipendente dall'attività dei fusi neuromuscolari poiché il comportamento di tali neuroni segue lo stesso modello descritto da Houk et al (1981) per descrivere la scarica delle terminazioni primarie dei fusi neuromuscolari. Quindi, sia per il cuneato esterno che per le cellule del Purkinje possiamo considerare la possibilità che tale scarsa sensibilità alla velocità abbia cause comuni risalenti alle prime fasi dell'elaborazione del segnale sensoriale.

I dati relativi alla posizione indicano che i segnali provenienti dalle cellule del nucleo cuneato esterno sembrano riprodursi nell'attività delle cellule del Purkinje senza cambiamenti significativi, come evidenziato dal fatto che le risposte neuronali associate al movimento in entrambe le strutture si correlavano fortemente solo con la prima componente principale. È possibile spiegare questo comportamento tenendo conto dell'organizzazione funzionale della corteccia cerebellare.

Le cellule del Purkinje ricevono un considerevole input dai granuli che, a loro volta, sono attivati dalle fibre muscolari (che originano dal nucleo cuneato esterno ma anche dalle vie spino- e reticolo-cerebellari). Nello strato molecolare, gli assoni dei granuli si ramificano formando le fibre parallele, che contraggono sinapsi con molte cellule del Purkinje lungo un

fascio corticale parallelo all'asse longitudinale del folium (attivazione a fascio delle fibre parallele delle cellule del Purkinje). Un'organizzazione di questo tipo è alla base dell'elevato livello d'integrazione dei segnali che provengono da differenti siti corticali e che convergono su ogni cellula del Purkinje. Tuttavia, prima di formare le fibre parallele, i tratti ascendenti degli assoni dei granuli formano anche connessioni sinaptiche dirette con le soprastanti cellule del Purkinje (Jaeger e Bower, 1994; Gundappa-Sulur et al., 1999). Studi recenti hanno evidenziato che queste connessioni più corte potrebbero giocare un ruolo importante nel regolare direttamente l'output dalle cellule del Purkinje mentre l'attivazione dalle fibre parallele servirebbe come modulazione della responsività delle cellule del Purkinje (Santamaria et al., 2002, 2007; Lu et al., 2005; Cohen and Yarom, 1998). In particolare, è stato dimostrato che la scarica dei tratti ascendenti degli assoni dei granuli eclissa quella proveniente dalle fibre parallele quando la sorgente di attivazione è rappresentata dalla stimolazione tattile (Lu et al., 2005) o dal movimento passivo (Kolb et al., 1997). In tal modo, la fedeltà nell'insieme della trasmissione delle informazioni afferenti alle cellule del Purkinje dalle fibre muscolari potrebbe dipendere (almeno in parte) dall'attività dei tratti ascendenti degli assoni dei granuli che, nelle nostre condizioni sperimentali, possono predominare sulle altre afferenze neuronali.

Un altro possibile fattore che potrebbe spiegare l'uniformità delle risposte della corteccia pre-cerebellare e cerebellare è la forte riduzione dei segnali centrali che avviene durante i movimenti passivi. Infatti, è stato dimostrato che gli input al cervelletto dalla corteccia cerebrale possono esercitare una modulazione sugli input sensoriali agli stessi siti corticali (Santori et al., 1986). Infine, sebbene non possiamo del tutto escludere l'influenza dell'anestesia all'uretano sulle risposte delle cellule del Purkinje, l'evidenza che l'uretano influisce minimamente sulla neurotrasmissione centrale e periferica (Maggi e Meli, 1986) potrebbe suggerire che anche le risposte ai movimenti passivi che abbiamo registrato fossero in minima parte influenzate dall'anestesia.

### **Ruoli separati della corteccia cerebellare intermedia e del nucleo interposito nel codificare i segnali sensoriali**

Un altro importante risultato di questo studio è rappresentato dal differente comportamento osservato nei neuroni del nucleo interposito confrontati a quelli del cuneato esterno e della corteccia spinocerebellare.

Venivano evidenziate infatti differenze sostanziali sul come le componenti del vettore velocità potrebbero essere rappresentate nel nucleo interposito, in confronto alla corteccia cerebellare. Infatti, mentre l'attività delle cellule del Purkinje veniva modulata principalmente dalla componente direzionale del vettore velocità, la componente scalare e la direzione venivano entrambe rappresentate dall'attività del nucleo interposito. Questo risultato, potrebbe essere in disaccordo con quanto riportato precedentemente in gatti svegli da Armstrong e Edgley (1988) che hanno trovato che i neuroni dell'interposito non venivano modulati dalla velocità durante la locomozione. Tuttavia, il campione di neuroni del nucleo interposito registrati da Armstrong e Edgley era molto più piccolo del nostro (21 neuroni) e i neuroni del nucleo interposito potrebbero rispondere in maniera differente durante movimenti generati passivamente rispetto a quelli generati attivamente a causa dell'influenza di segnali sensoriali aggiuntivi che provengono dagli organi tendinei del Golgi e collegati alla produzione di forza muscolare e all'integrazione dei segnali motori efferenti che raggiungono il cervelletto intermedio attraverso la via cortico-ponto-cerebellare. Nell'insieme, sulla base dei risultati precedenti e presenti, possiamo ipotizzare che, almeno per i movimenti passivi dell'arto, i neuroni del nucleo interposito potrebbero estrarre le informazioni relative alla velocità dai segnali sensoriali portati dalle collaterali delle fibre muscolari, indicando un'influenza indipendente delle fonti extracerebellari sul nucleo interposito rispetto all'influenza inibitoria esercitata dalla corteccia cerebellare sul nucleo.

Ciò potrebbe essere in accordo con l'idea portata avanti da alcuni autori (Holdefer et al, 2005; Eccles et al, 1967; Thach, 1970; Houk et al, 1993) secondo la quale l'attività dei neuroni del nucleo interposito associata al movimento, potrebbe essere guidata prevalentemente dall'influenza eccitatoria delle collaterali delle fibre muscolari e rampicanti e rifinita dall'azione inibitoria esercitata dalle cellule del Purkinje.

Un ulteriore risultato di questo studio riguarda una potenziale distinzione funzionale tra le porzioni anteriore e posteriore del nucleo rispetto alla codifica del vettore velocità del movimento. Infatti, tra i neuroni del nucleo interposito che venivano modulati dalla cinematica del movimento, quelli che si trovavano nella porzione posteriore mostravano una sensibilità preferenziale per la componente scalare del vettore velocità (*speed*), mentre quelli della porzione anteriore evidenziavano una rappresentazione dell'intero vettore velocità. La codifica della *speed* potrebbe rappresentare uno stadio sensoriale precoce per l'analisi dei segnali per controllare la *speed* dell'arto o altre variabili scalari come la forza. L'importanza del nucleo

interposito per il controllo della *speed* durante movimenti attivi è stata sottolineata da molti autori (Burton e Onoda, 1977; Miall et al, 1987; Van Kan et al, 1993; Milak et al, 1997; Mason et al, 1998; Burton e Onoda, 1978). Per esempio, la prevalenza di unità sensibili alla *speed* trovata nella porzione posteriore del nucleo interposito dal presente studio potrebbe essere in accordo con i risultati di Miall et al. (1987) e Mason et al. (1998), che indicavano questa porzione dell'interposito come sito potenziale per la codifica delle informazioni sulla *speed* del movimento. Inoltre, Thach (1978), studiando movimenti di prensione in scimmie sveglie, ha trovato che l'attività di scarica nella parte posteriore dei nuclei dentato e interposito veniva modulata dall'entità del peso applicato.

Questa specificità potrebbe indicare differenze funzionali più generiche tra le due porzioni del nucleo interposito. Sebbene mappe somatotopiche separate degli arti sono state trovate nella porzione anteriore e posteriore del nucleo interposito (van Kan et al, 1993; Thach et al, 1993), si dibatte ancora sul fatto che queste mappe sottostiano o meno a distinte funzioni di controllo motorio. Questa possibilità viene supportata da prove sperimentali crescenti. Mason et al. (1998) hanno dimostrato che, in seguito a inattivazione specifica della porzione anteriore e posteriore del nucleo interposito attraverso microiniezioni di muscimolo in scimmie, la conformazione della mano prima della prensione e la manipolazione venivano rappresentate nella parte anteriore del nucleo interposito, mentre i movimenti per raggiungere oggetti erano rappresentati nella porzione posteriore. I deficit nella stabilizzazione durante il movimento per raggiungere un oggetto che seguivano all'inattivazione della porzione posteriore del nucleo interposito dovrebbero essere più collegati al controllo della *speed* dell'intero arto piuttosto che a deficit nella manipolazione della mano, associata all'inattivazione della porzione anteriore. Infatti, Mason e al. (1998) riportavano che, durante l'inattivazione della porzione posteriore del nucleo interposito, una scimmia mostrava deficit ristretti al controllo della *speed* del movimento dell'arto, il che risultava in una diminuita accuratezza della traiettoria necessaria per raggiungere un oggetto. Un'ulteriore supporto all'esistenza di funzioni separate nel nucleo interposito veniva fornita da Martin et al. (2000) che dimostrava come l'inattivazione della porzione anteriore del nucleo interposito rispetto a quella posteriore produceva difficoltà diverse nel controllo e nell'adattamento della traiettoria di movimento della zampa anteriore.

Queste funzioni differenti sembrano essere coerenti anche con l'organizzazione differenziale delle connessioni di entrata e uscita delle due porzioni del nucleo interposito. Per esempio, la porzione anteriore riceve l'afferenza delle fibre rampicanti dal nucleo olivare accessorio

rostrale dorsale, che trasmette in maniera predominante informazioni cutanee, mentre il nucleo olivare accessorio rostrale mediale fornisce l'afferenza delle fibre rampicanti alla porzione posteriore e trasmette soprattutto informazioni propriocettive (Gellman et al, 1983; Gellman et al, 1985). Secondo questo schema, le differenze funzionali fra la porzione anteriore del nucleo interposito e quella posteriore potrebbero corrispondere all'organizzazione compartimentalizzata della corteccia paravermale. Infatti, i moduli C1 e C3, proiettando alla porzione anteriore, e il modulo C2, che proietta a quella posteriore, mostravano un'attività selettiva in relazione alle varie fasi del ciclo del passo durante la locomozione (Apps e Hartell, 1995) o alla fase precoce o tardiva di un movimento di raggiungimento col braccio (sebbene in questo caso le differenze fossero meno evidenti che nella locomozione; Apps et al, 1997).

Un'ulteriore conferma della separazione di ruoli fra la corteccia cerebellare intermedia ed il nucleo interposito deriva dall'analisi delle componenti principali applicata ai dati sulla posizione della zampa. Infatti, si notava che la modulazione di scarica dei neuroni del nucleo interposito da parte del movimento passivo era indipendente dalle risposte mostrate dalle altre due strutture, tanto che essa era associata alla seconda componente principale dell'intero gruppo di dati che spiegava il 25% della varianza della popolazione totale.

Un comportamento differente veniva osservato nelle tre strutture anche a proposito della profondità di modulazione nell'attività di scarica. Le cellule del Purkinje e del cuneato esterno evidenziavano una distribuzione bimodale di scarica includendo neuroni ad alta e bassa frequenza di scarica mentre le cellule del nucleo interposito erano caratterizzate da una distribuzione unimodale centrata su basse frequenze di scarica. Come documentato da vari autori, questi dati confermano che i neuroni dei nuclei cerebellari tendono a scaricare a frequenze più basse delle cellule del Purkinje (Thach, 1968; Aizenman and Linden, 1999). È possibile che alcune proprietà biofisiche dei neuroni del nucleo interposito possano spiegare queste differenze nella frequenza di scarica. Alcuni studi sui canali al sodio voltaggio-dipendenti espressi nella membrana cellulare dei neuroni cerebellari hanno infatti mostrato che l'inattivazione dei canali al sodio dei nuclei era più lenta e che la corrente di sodio ripristinata dopo l'inattivazione era più piccola di quella osservata nelle cellule del Purkinje (Raman et al., 2000; Aman and Raman, 2007). Questo dà luogo ad un più lungo periodo refrattario delle cellule dei nuclei cerebellari e quindi a più basse frequenze di scarica. Un'altra possibile fonte per i diversi comportamenti cellulari riportati in questo lavoro potrebbe anche essere a livello dei circuiti. Infatti, mentre il segnale periferico raggiunge le cellule del Purkinje tramite le fibre

muscolari, l'attività delle cellule del nucleo interposito è modulata dalla convergenza di fibre muscolari collaterali eccitatorie e afferenze inibitorie dalle cellule del Purkinje (Thach, 1972; Eccles et al., 1974). Da un punto di vista funzionale, la chiara separazione dell'orientamento e della lunghezza degli assi dell'arto tra la prima e la seconda componente principale potrebbe riflettere uno schema generale di controllo dei movimenti dell'arto anteriore secondo il quale la corteccia svolgerebbe un ruolo predominante nella gestione generale del movimento, cioè l'orientamento degli assi, mentre il nucleo interposito contribuirebbe più specificatamente al posizionamento dell'estremità dell'arto aggiustando la lunghezza complessiva (Paulignan and Jeannerod, 1996; Rand et al., 2000; Zackowski et al., 2002). Questo schema è in linea con alcuni studi che provano lo specifico ruolo del nucleo interposito nel controllo della fase terminale dei movimenti di raggiungimento che è principalmente determinata da cambiamenti nella lunghezza dell'arto (van Kan et al., 1993a,b, 1994; Gibson et al., 1996; Mason et al., 1998; Milak et al., 1997; Martin et al., 2000; Monzee et al., 2004). In particolare van Kan et al. (1994) hanno dimostrato nella scimmia che l'orientamento dell'arto non influenzava l'attività delle cellule del nucleo interposito poiché le unità dello stesso scaricavano durante i movimenti di raggiungimento senza tener conto della traiettoria o della direzione del movimento. Inoltre, l'inattivazione del nucleo interposito nel gatto produceva errori nel compito di raggiungimento dipendenti dalla localizzazione delle cellule nel nucleo (Martin et al., 2000). Questo potrebbe indicare una possibile codifica predominante della lunghezza da parte dei neuroni del nucleo interposito. Dovrebbe inoltre essere sottolineato che il ruolo specifico immaginato per il nucleo interposito nel controllo dei movimenti di raggiungimento non è distinto da una rappresentazione più globale dell'arto. Per esempio, l'attività del nucleo interposito può essere modulata dai movimenti delle mani solo durante movimenti dell'intero arto, mentre essa risulta assente per movimenti della sola articolazione del polso (van Kan et al., 1993a; Monzee et al., 2004). Nel complesso questi risultati suggeriscono che le differenze nel codificare le informazioni sensoriali tra la corteccia cerebellare e il nucleo interposito potrebbe essere dovuta al ruolo specifico che queste strutture potrebbero svolgere durante il controllo attivo dei movimenti dell'arto. Questa idea fu anche proposta da Apps e Garwicz (2005) per l'integrazione sensori-motoria dei segnali tattili nel cervelletto e, in accordo a questo modello, i nostri dati supportano l'idea che le rappresentazioni propriocettive cerebellari possano essere considerate come mappe computazionali basate sull'azione piuttosto che mappe puramente sensoriali.

## BIBLIOGRAFIA

- Aizenman CD, Linden DJ (1999) Regulation of the rebound depolarization and pontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 82, 1697–1709.
- Aman TK, Raman IM (2007) Subunit dependence of Na channel slow inactivation and open channel block in cerebellar neurons. *Biophys J* 92, 1938–1951.
- Apps R, Hartell N (1995) Gating of spino-olivocerebellar pathways in the awake cat. In: Taylor A, Gladden MH, Durbaba R (eds) *Alpha and gamma motor systems*. Plenum, New York, 403–405.
- Apps R, Atkins MJ, Garwicz M (1997) Gating of cutaneous input to cerebellar climbing fibres during a reaching task in the cat. *J Physiol* 502, 203–214.
- Apps R, Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci* 6, 297–311.
- Armstrong DM, Edgley SA (1988) Discharges of interpositus and Purkinje cells of the cat cerebellum during locomotion under different conditions. *J. Physiol (Lond.)* 400, 425-445.
- Arshavsky YI, Gelfand IM, Orlovsky GN, Pavlova GA (1978) Messages conveyed by spinocerebellar pathways during scratching in the cat. II. Activity of the neurons of the ventral spinocerebellar tract. *Brain Res* 151 (3), 493-506.
- Bosco G, Rankin A, Poppele R (1996) Representation of passive hindlimb postures in cat spinocerebellar activity. *J Neurophysiol* 76, 715–726.
- Bosco G, Poppele RE (1999) Low sensitivity of dorsal spinocerebellar neurons to limb movement speed. *Exp Brain Res* 125, 313-322.

- Bosco G, Giaquinta G, Valle MS, Caserta C, Casabona A, Perciavalle V (2000) Distribution of spinocerebellar Purkinje cell responses to passive forelimb movements in the rat. *Eur J NeuroSci* 12, 4063–4073.
- Bosco G, Poppele RE (2001) Proprioception from a spinocerebellar perspective. *Physiol Rev* 81, 539-568.
- Burton JE, Onoda N (1977) Interpositus neuron discharge in relation to a voluntary movement. *Brain Res* 121, 167–172.
- Burton JE, Onoda N (1978) Dependence of the activity of interpositus and red nucleus neurons on sensory input data generated by movement. *Brain Res* 152, 41–63.
- Casabona A, Valle MS, Bosco G, Garifoli A, Lombardo SA, Perciavalle V (2003) Anisotropic representation of forelimb position in the cerebellar cortex and nucleus interpositus of the rat. *Brain Res* 972, 127–136.
- Casabona A, Valle MS, Bosco G, Perciavalle V (2004) Cerebellar encoding of limb position. *Cerebellum* 3:172–177
- Cohen D, Yarom Y (1998) Patches of synchronized activity in the cerebellar cortex evoked by mossy-fiber stimulation: questioning the role of parallel fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15032–15036.
- Eccles JC, Ito M, Szentagothai J (1967) *Cerebellum as a neuronal machine*. Springer, New York.
- Eccles JC, Rosén I, Scheid P, Táboríková H (1974) Patterns of convergence onto interpositus neurons from peripheral afferents. *J Neurophysiol* 37, 1438–1448.
- Ekerot CF, Garwicz M, Jorntell H (1997) The control of forelimb movements by intermediate cerebellum. *Prog Brain Res* 114, 423–429.
- Garifoli A, Caserta C, Bosco G, Lombardo SA, Casabona A, Perciavalle V (2002) Kinematic features of passive forelimb movements and rat cuneate neuron discharges. *NeuroReport* 13, 267–271.

- Gellman R, Houk JC, Gibson AR (1983) Somatosensory properties of the inferior olive of the cat. *J Comp Neurol* 215, 228–243.
- Gellman R, Gibson AR, Houk JC (1985) Inferior olivary neurons in the awake cat: detection of contact and passive body displacement. *J Neurophysiol* 54, 40–60.
- Giaquinta G, Casabona A, Valle MS, Bosco G, Perciavalle V (1999) On the relation of rat's external cuneate activity to global parameters of forelimb posture. *Neuroreport* 10, 3075-3080.
- Gibson AR, Horn KM, Stein JF, Van Kan PL (1996) Activity of interpositus neurons during a visually guided reach. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 499–512.
- Glaser EM, Ruchkin DS (1976) Principles of neurobiological signal analysis, pp 223–290. New York: Academic Press.
- Gundappa-Sulur G, De Schutter E, Bower JM (1999) Ascending granule cell axon: an important component of cerebellar cortical circuitry. *J Comp Neurol* 408, 580–596.
- Holdefer RN, Houk JC, Miller LE (2005) Movement-related discharge in the cerebellar nuclei persists after local injections of GABA(A) antagonists. *J Neurophysiol* 93(1), 35–43.
- Houk JC, Rymer WZ, Crago PE (1981). Dependence of dynamic response of spindle receptors on muscle length and velocity. *J Neurophysiol* 46(1), 143-166.
- Houk JC, Keifer J, Barto AG (1993) Distributed motor commands in the limb premotor network. *Trends Neurosci* 16, 27–33.
- Jaeger D, Bower JM (1994) Prolonged responses in rat cerebellar Purkinje cells following activation of the granule cell layer: an intracellular in vitro and in vivo investigation. *Exp Brain Res* 100, 200–214.
- Johnson MT, Ebner TJ (2000) Processing of multiple kinematic signals in the cerebellum and motor cortices. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 155–168.

- Jueptner M, Ottinger S, Fellows SJ, Adamschewski J, Flerich L, Muller SP, Diener HC, Thilmann AF, Weiller C (1997) The relevance of sensory input for the cerebellar control of movements. *Neuroimage* 5, 41–48.
- Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE (1988) *Applied regression analysis and other multivariable methods*, pp 595–641. Boston: PWSKENT Publishing Company.
- Kolb FP, Arnold G, Lerch R, Straka H, Buttner-Ennever J (1997) Spatial distribution of field potential profiles in the cat cerebellar cortex evoked by peripheral and central inputs. *Neuroscience* 81, 1155–1181.
- Kuno M, Munoz-Martinez EJ, Randic M (1973) Sensory inputs to neurones in Clarke's column from muscle, cutaneous and joint receptors. *J Physiol* 228 (2), 327-342.
- Lu H, Hartmann MJ, Bower JM (2005) Correlations between Purkinje cell single-unit activity and simultaneously recorded field potentials in the immediately underlying granule cell layer. *J Neurophysiol* 94:1849–1860.
- Maggi CA, Meli A (1986) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General consideration. *Experientia* 42, 109–114.
- Martin JH, Cooper SE, Hacking A, Ghez C (2000) Differential effects of deep cerebellar nuclei inactivation on reaching and adaptive control. *J Neurophysiol* 83, 1886–1899.
- Mason CR, Miller LE, Baker JF, Houk JC (1998) Organization of reaching and grasping movements in the primate cerebellar nuclei as revealed by focal muscimol inactivations. *J Neurophysiol* 79, 537–554.
- Mason CR, Hendrix CM, Ebner TJ (2006) Purkinje cells signal hand shape and grasp force during reach-to-grasp in the monkey. *J Neurophysiol* 95, 144–158.
- Miall RC, Weir DJ, Stein JF (1987) Visuo-motor tracking during reversible inactivation of the cerebellum. *Exp Brain Res* 65, 455–464.

- Milak MS, Shimansky Y, Bracha V, Bloedel JR (1997) Effects of inactivating individual cerebellar nuclei on the performance and retention of an operantly conditioned forelimb movement. *J Neurophysiol* 78, 939–959.
- Monzee J, Smith AM (2004) Responses of cerebellar interpositus neurons to predictable perturbations applied to an object held in a precision grip. *J Neurophysiol* 91, 1230–1239.
- Monzee J, Drew T, Smith AM (2004) Effects of muscimol inactivation of the cerebellar nuclei on precision grip. *J Neurophysiol* 91, 1240–1249.
- Oscarsson O (1965) Functional organization of the spino- and cuneocerebellar tracts. *Physiol Rev* 45, 495–522.
- Paulignan Y, Jeannerod M (1996) Prehension movements: the visuomotor channels hypothesis revisited. In: *Hand and brain* (Wing AM, Haggard P, Flanagan J, eds), pp 265–282. San Diego: Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2<sup>nd</sup> edn, Academic Press, Sydney.
- Poppele RE, Bosco G, Rankin AM (2002) Independent representations of limb axis length and orientation in spinocerebellar response components. *J Neurophysiol* 87, 409–422.
- Raman IM, Gustafson AE, Padgett D (2000) Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *J Neurosci* 20, 9004–9016.
- Rand MK, Shimansky Y, Stelmach GE, Bracha V, Bloedel JR (2000) Effects of accuracy constraints on reach-to-grasp movements in cerebellar patients. *Exp Brain Res* 135, 179–188.
- Roitman AV, Pasalar S, Johnson MT, Ebner TJ (2005) Position, direction of movement, and speed tuning of cerebellar Purkinje cells during circular manual tracking in monkey. *J Neurosci* 25, 9244–9257.

- Santamaria F, Jaeger D, De Schutter E, Bower JM (2002) Modulatory effects of parallel fiber and molecular layer interneuron synaptic activity on Purkinje cell responses to ascending segment input: a modeling study. *J Comput Neurosci* 13, 217–235.
- Santamaria F, Tripp PG, Bower JM (2007) Feedforward inhibition controls the spread of granule cell-induced Purkinje cell activity in the cerebellar cortex. *J Neurophysiol* 97:248–263.
- Santori EM, Der T, Collins RC (1986) Functional metabolic mapping during forelimb movement in rat. II. Stimulation of forelimb muscles. *J Neurosci* 6, 463–474.
- Thach WT (1968) Discharge of Purkinje and cerebellar nuclear neurons during rapidly alternating arm movements in the monkey. *J Neurophysiol* 31, 785–797.
- Thach WT (1970) Discharge of cerebellar neurons related to two maintained postures and two prompt movements. II. Purkinje cell output and input. *J Neurophysiol* 33, 537–547.
- Thach WT (1972) Cerebellar output: properties, synthesis and uses. *Brain Res* 40, 89–102.
- Thach WT (1978) Correlation of neural discharge with pattern and force of muscular activity, joint position, and direction of intended next movement in motor cortex and cerebellum. *J Neurophysiol* 41, 654–676.
- Thach WT, Perry JG, Kane SA, Goodkin HP (1993) Cerebellar nuclei: rapid alternating movement, motor somatotopy, and a mechanism for the control of muscle synergy. *Rev Neurol (Paris)* 149, 607–628.
- Thach WT, Bastian AJ (2004) Role of the cerebellum in the control and adaptation of gait in health and disease. *Prog Brain Res* 143, 353–366.
- Valle MS, Bosco G, Poppele RE (2000) Information processing in the spinocerebellar system. *Neuroreport* 11, 4075–4079.

- Valle MS, Casabona A, Bosco G, Peciavalle V (2007) Spatial anisotropy in the encoding of three-dimensional passive limb position by the spinocerebellum. *Neuroscience* 144, 783–787.
- van Kan PL, Houk JC, Gibson AR (1993a) Output organization of intermediate cerebellum of the monkey. *J Neurophysiol* 69, 57-73.
- van Kan PL, Gibson AR, Houk JC (1993b) Movement-related inputs to intermediate cerebellum of the monkey. *J Neurophysiol* 69, 74-94.
- van Kan PL, Horn KM, Gibson AR (1994) The importance of hand use to discharge of interpositus neurones of the monkey. *J Physiol* 480, 171–190.
- Zackowski KM, Thach WT Jr, Bastian AJ (2002) Cerebellar subjects show impaired coupling of reach and grasp movements. *Exp Brain Res* 146, 511–522.