



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA E
DELL'INNOVAZIONE**

Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e
Biomedica e della Vigilanza sugli Enti
Ufficio III-IV

RELAZIONE FINALE RICERCA FINALIZZATA

Istituto/D.I.	Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino IRCCS		
Titolo ricerca	Induction of long-term synaptic plasticity in the human cerebellum by repetitive TMS: cellular mechanisms and implications for rehabilitation in ataxia		
Responsabile	Prof. Egidio D' Angelo		
Data convenzione	25/10/2011		
Cod. ricerca	056/RF-2009-1475845		
Data Inizio	1/12/2011	Data fine autorizzata	30/11/2014

Relazione Finale	Data Compilazione: 28-01-2015
-------------------------	-------------------------------

A. Unità Operative partecipanti:

IRCCS Fondazione "Istituto Neurologico C. Mondino - Unità di Neurofisiologia clinica del Brain Connectivity Center (BCC) con la Fisiologia del Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento dell'Università di Pavia

Collaborazioni:

IRCCS Fondazione S. Lucia, laboratorio di TMS (responsabile Dr. Giacomo Koch).

B. Obiettivi del progetto –

1. Indagare, mediante l'uso della rTMS, il ruolo della memoria sensori-motoria del cervelletto in movimenti saccadici, in particolare:
 - l'apprendimento e il riutilizzo di informazioni sensori-motorie nei circuiti cerebro-oculari;
 - la variazione di plasticità sinaptica interna dopo TBS (da sola o in associazione con memantina) all'area oculo-motoria del verme cerebellare.
2. Studiare il circuito motorio cortico-cerebellare utilizzando la rTMS per modificare la plasticità del cervelletto e farmaci che agiscono sui recettori NMDA per determinare i meccanismi.
3. Verificare la potenziale efficacia riabilitativa della rTMS applicata a pazienti colpiti da ictus che presentano atassia cerebellare.
4. Indagare l'effetto del TBS su sinapsi afferenti alle cellule del Golgi e alle cellule del Purkinje e verificare l'eventuale coinvolgimento di recettori recettori NMDA sulle forme di plasticità indotte.

C. Metodologia applicata: -

1. Investigazioni neuro-radiologiche (**Unità di Neurofisiologia clinica del BCC**):
 - Stimolazione Magnetica Transcranica ripetitiva (rTMS) .
 - Sessioni di cTBS.
 - Registrazioni del movimento saccadico mediante video a infrarossi.
 - Registrazioni elettromiografiche (EMG).



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA E
DELL'INNOVAZIONE**

Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e
Biomedica e della Vigilanza sugli Enti
Ufficio III-IV

2. Studi neurofisiologici (**Laboratorio TMS - IRCCS Santa Lucia di Roma**):
 - Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) singola e accoppiata.
 - Sessioni di iTBS.
 - Misurazioni di inibizione cerebello cerebrale (CBI), inibizione breve intracorticale (SICI), facilitazione intra-corticale (ICF).
 - Somministrazione di scale neurologiche (scala MICARS).
3. Tecniche elettrofisiologiche sia in vitro sia in vivo (**Fisiologia del Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento dell'Università di Pavia**)
 - Patch-clamp da cellule granulari, cellule del Golgi, cellule del Purkinjia in cervelletto di ratto.
 - Stimolazione TBS da sola o associata a farmaci attivi sui recettori NMDA.

D. Risultati ottenuti complessivi e delle singole unità operative:

D.1. Risultati Complessivi:

Il progetto ha portato alla definizione di un quadro integrato della plasticità sinaptica e della funzionalità cerebellare.

- 1) Nell'uomo è stato possibile dimostrare, mediante interferenza TMS con l'adattamento dei movimenti saccadici e del riflesso palpebrale, uno specifico contributo cerebellare nell'apprendimento motorio. I dati sono stati interpretati mediante un modello matematico di apprendimento. In entrambi i casi sono stati impiegati stimoli TBS.
- 2) Nell'animale da esperimento è stato possibile dimostrare che stimoli TBS inducono specifiche forme di plasticità sinaptica a lungo termine.
- 3) Infine, è stato mostrato che TBS cerebellare può interferire con il recupero funzionale dopo stroke.

D.2 Risultati Singole UO:

IRCCS C.Mondino – BCC

Interferenza TMS con la correzione di errore nei riflessi saccadici

I riflessi saccadici sono stati misurati mediante un sistema video a infrarossi (EyeSeeCam) in tre sessioni:

1. Placebo prima del cTBS (PcTBS)
2. Memantina prima del cTBS (McTBS)
3. Placebo prima del falso cTBS (PshamTBS)

L'acquisizione è stata fatta prima e dopo 40 secondi del cTBS o del falso cTBS; un blocco addizionale di registrazioni è stato eseguito 24 ore più tardi. L'adattamento è stato testato col paradigma sperimentale classico di doppio-step in cui è evocato un errore spaziale durante la generazione del riflesso saccadico e rafforza un processo di adattamento nei circuiti neurali corrispondenti. Il risultato principale di questo lavoro è la dimostrazione che un protocollo di stimolazione continua a ritmo theta (cTBS) applicata al verme del cervelletto determina modificazioni a lungo termine nell'adattamento saccadico. Questo adattamento può essere prevenuto da antagonisti dei recettori glutammatergici (NMDAR) come la memantina. Ciò suggerisce che forme di plasticità dipendenti dagli NMDAR prendono parte nell'adattamento sensorimotorio nel circuito cerebellare umano (Colnaghi et al. *in preparation*). Questo processo che coinvolge meccanismi di adattamento e disadattamento può quindi fornire nuovi strumenti per il controllo delle funzioni cerebellari in stati patologici.



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA E
DELL'INNOVAZIONE**

Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e
Biomedica e della Vigilanza sugli Enti
Ufficio III-IV

Interferenza TMS con il condizionamento del riflesso palpebrale

Nel presente progetto sono stati eseguiti studi di Eyeblink Classical Conditioning (EBCC) mediante appositi protocolli di condizionamento che sono stati combinati con tecnologie TMS. I protocolli ed i test sono stati disegnati al fine di applicare opportuni modelli matematici e consentirne una interpretazione computazionale. La TMS è stata impiegata al fine di interferire con la formazione della memoria. Gli esperimenti hanno dimostrato che una componente temporale veloce dell'adattamento dell'EBCC è relativa alla corteccia cerebellare mentre una componente temporale lenta è relativa a strutture nucleari profonde. Infine, una componente aggiuntiva consente di generare il consolidamento della memoria attraverso una crescita del processo lento. La stimolazione TMS ha interferito sostanzialmente con il processo veloce localizzato presumibilmente nella corteccia cerebellare. I risultati sono stati interpretati utilizzando un modello matematico a due stati che integra le due fasi dell'apprendimento. Questi dati suggeriscono che la cTBS può dissociare la fase di estinzione EBCC (relativa al processo di apprendimento veloce) dalla fase di consolidamento (relativa al processo di apprendimento lento).

Fisiologia Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento, Università di Pavia

I meccanismi della plasticità sinaptica sono stati studiati mediante tecniche di elettrofisiologia cellulare (patch-clamp) in fettine di tessuto cerebellare. I risultati hanno dimostrato che la plasticità sinaptica a lungo termine causata da impulsi TBS nello strato granulare del cervelletto è facilitata dall'acetilcolina che agisce su recettori nicotinici di tipo $\alpha 7$. La localizzazione delle subunità dei recettori nicotinici è stata inoltre verificata mediante l'immunolocalizzazione in microscopia elettronica, mostrando la presenza di subunità $\alpha 7$ dei recettori nicotinici sia in elementi pre- che post-sinaptici. E' quindi possibile che i recettori nicotinici di tipo $\alpha 7$ possano regolare la trasmissione sinaptica fibra muscoide-granulo agendo su meccanismi sia pre- che post-sinaptici.

In conclusione, si è dimostrato che i farmaci colinergici, in associazione ad un protocollo di stimolazione a ritmo theta (TBS), aumentano la plasticità a lungo termine (LTP) nel cervelletto in vitro e in vivo attraverso l'attivazione di recettori colinergici $\alpha 7$, indicando il ruolo di questi ultimi nel meccanismo di controllo cerebellare di apprendimento (Prestori et al. 2013).

Sono inoltre in corso esperimenti in fettina che mostrano:

- un'efficace induzione di plasticità a ritmo theta (4-8 Hz) a livello della sinapsi tra fibre parallele e cellule del Purkinje nel circuito cerebellare sia in vitro che in vivo (Congi et al., *in preparation*);
- l'induzione di plasticità sinaptica a lungo termine (LTP e LTD) nello strato granulare del cervelletto sembra dipendere dalla relazione di fase tra stimolo sinaptico e potenziale d'azione nelle cellule granulari sulla banda theta (4-8 Hz) (Sgritta et al., *in preparation*).

IRCCS Santa Lucia di Roma

Sono stati investigati gli effetti della Stimolazione Magnetica Transcranica ripetitiva (rTMS) applicata all'emisfero cerebellare lesa in 6 pazienti con ictus circolatorio posteriore (PCS). A questi pazienti sono state applicate stimolazioni cerebellari intermittenti a ritmo theta (iTBS) con rTMS della durata di due settimane. Al fine di esplorare la connettività funzionale tra l'emisfero cerebellare lesa dall'ictus e la corteccia motoria controlaterale è stato utilizzato uno stimolo paired-



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA E
DELL'INNOVAZIONE**

Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e
Biomedica e della Vigilanza sugli Enti
Ufficio III-IV

pulse mediante TMS, mentre per la misurazione dell'eccitabilità della corteccia motoria controlaterale sono stati valutati i seguenti parametri: l'inibizione intracorticale breve (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF). Al fine di valutare se il protocollo con iTBS potesse migliorare i sintomi della disfunzione cerebellare, i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica mediante l'amministrazione della scala MICARS sia prima che dopo iTBS. I dati raccolti dallo studio mostrano che in pazienti con ictus al cervelletto la iTBS applicata all'emisfero cerebellare è effettivamente in grado di modulare i circuiti intra-corticali della corteccia motoria controlaterale e di modificare la connettività funzionale cerebello-motoria. In più, questi cambiamenti neurofisiologici sono associati ad un miglioramento clinico dei sintomi posturali e atassici.

E. Abstract Ricerca per la pubblicazione Internet

Il progetto ha portato alla definizione di un quadro integrato del ruolo e dei meccanismi della plasticità sinaptica nel controllare la funzionalità cerebellare. Nell'uomo è stato possibile dimostrare, mediante interferenza TMS (pattern TBS, theta-burst stimulation) con l'adattamento dei movimenti saccadici e del riflesso palpebrale, uno specifico contributo cerebellare nell'apprendimento motorio. I dati sono stati interpretati mediante un modello matematico di apprendimento. Infine, è stato mostrato che la stimolazione cerebellare con TMS può facilitare con il recupero funzionale dopo stroke. Nell'animale da esperimento è stato possibile dimostrare che gli stimoli TBS inducono specifiche forme di plasticità sinaptica a lungo termine. Questi risultati pertanto suggeriscono che la stimolazione TMS mediante patterns TBS può determinare modifiche nello stato plastico delle sinapsi del circuito cerebellare con potenziali applicazioni neuroriabilitative.

F1. Prodotti della Ricerca (correlati al progetto)

- Messa a punto di protocolli TMS cerebellare
- Lavori sperimentali
- Test clinici preliminari
- Disseminazione a congressi

Partecipazione a Congressi

- *ISMIRM 2013*- April 20th-26th - Salt Lake City, Utah USA - ISMIRM 21st Annual Meeting and Exhibition
- *ISMIRM 2014* - May, 10-16, Milano, Italy - ISMIRM Joint Annual Meeting - International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMIRM) - 30th Joint Annual Meeting
- *FENS 2012*- July 14th-18th - Barcelona, Spain - Forum of Neuroscience International Convention Center (CCIB)
- *FENS2014* - July 5th-9th Milano, Italy
- *SINS 2011*- October 4th-6th Milano, Italy
- *SINS 2013* - October 3rd-5th - Rome, Italy SINS - XV National Congress of the Italian Society of Neuroscience
- May, 14-16, Alghero, Italy - OPEN SOURCE BRAIN (OBS) 2014 - OBS Workshop 2014: "Building and sharing models of the cortex"



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA E
DELL'INNOVAZIONE**

Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e
Biomedica e della Vigilanza sugli Enti
Ufficio III-IV

F.2 Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- E. D'Angelo, S. Casali. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Frontiers in Neural Circuits*. Vol 6, article 116, January 2013.
- D. Gandolfi, P. Lombardo, J. Mapelli, S. Solinas and E. D'Angelo. Theta-frequency resonance at the cerebellum input stage improves spike timing on the millisecond time-scale. *Frontiers in Neural Circuits*. Vol. 7, article 64, (in press - April 2013).
- F. Prestori, C. Bonardi, L. Mapelli, P. Lombardo, R. Goselink, M. Egle De Stefano, D. Gandolfi, J. Mapelli, D. Bertrand, M. Schonewille, C. De Zeeuw, E. D'Angelo. Gating of Long-Term Potentiation by Nicotinic Acetylcholine Receptors at the Cerebellum Input Stage. *Plos One*. May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e64828.
- J. A Garrido, E. Ros, E. D'Angelo. Spike timing regulation on the millisecond scale by distributed synaptic plasticity at the cerebellum input stage: a simulation study. *Frontiers in computational neuroscience*. May2013 – Volume7 – Article 64.
- E. D'Angelo, S. Solinas, J. Mapelli, D. Gandolfi, L. Mapelli, F. Prestori. The cerebellar Golgi cell and spatiotemporal organization of granular layer activity. *Frontiers in Neural Circuits*. May2013 - Volume7 - Article93.
- E. D'Angelo; P. Mazzarello. MRI observation of hippocampal degeneration in Alzheimer's disease: A forgotten case. *Functional Neurology* Volume 28, Issue 3, July 2013, Pages 245-246.
- J.A. Garrido Alcazar, N.R. Luque, E. D'Angelo. Distributed cerebellar plasticity implements adaptable gain control in a manipulation task: a closed-loop robotic simulation. *Frontiers in neural circuits*, ottobre 2013.
- E. D'Angelo, S. Solinas, J. Garrido, C. Casellato, A. Pedrocchi, J. Mapelli, D. Gandolfi, F. Prestori. Realistic modeling of neurons and networks: towards brain simulation. *Functional Neurology* 2013; 28(3): 153-166.
- D. Gandolfi, P. Pozzi, M. Tognolina, G. Chirico, J. Mapelli and E. D'Angelo. "The spatiotemporal organization of cerebellar network activity resolved by two-photon imaging of multiple single neurons". *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2014).
- G. Castellazzi, F. Palesi, S. Casali, P. Vitali, E. Sinforiani, C.A.M. Wheeler-Kingshott, E.D'Angelo. A comprehensive assessment of resting state networks: bidirectional modification of functional integrity in cerebro-cerebellar networks in dementia. *Front. Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2014.00223
- F. Palesi, D. J. Tournier, F. Calamante, N. Muhlert, G. Castellazzi, D. Chard, E. d'Angelo, C.A.M. Wheeler-Kingshott. Contralateral cerebello-thalamo-cortical pathways with prominent involvement of associative areas in human in-vivo. *Brain Structure and Function*. 2014 Aug 19.
- Monaco J., Casellato C., Koch G., D'Angelo E. Cerebellar theta burst stimulation dissociates memory components in eyeblink classical conditioning. *European Journal of Neuroscience* in press.
- S. Subramaniyam, S. Solinas, P. Perin, F. Locatelli, S. Masetto, E. D'Angelo. Computational modeling predicts the ionic mechanism of late-onset responses in Unipolar Brush Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. in press.
- Luque NR, Garrido JA, Carrillo RR, D'Angelo E, Ros E. Fast convergence of learning requires plasticity between inferior olive and deep cerebellar nuclei in a manipulation task: a closed-loop robotic simulation. *Front Comput Neurosci*. 2014 Aug 15;8:97. doi: 10.3389/fncom.2014.00097. eCollection 2014.
- Koch G, D'Angelo E (2014) Magnetic stimulation of the cerebellum. Moving towards the clinic. *Funct Neurol*. 2014 Jan-Mar;29(1):5