

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE
E SPERIMENTALI
NEUROSCIENZE
XXV ciclo

**VERSO LA COMPrensIONE DELLO STATO
VEGETATIVO E DI MINIMA COSCIENZA**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof.ssa Elena Pegoraro

Supervisore :Ch.mo Prof. Leontino Battistin

Dottorando: Marianna Cavinato

**Al di là di me stesso,
in un luogo che ignoro,
aspetto il mio arrivo.**

Octave Paz

INDICE

INTRODUZIONE	1
IL CONCETTO DI COSCIENZA	2
(i) <i>Coscienza come stato di veglia</i>	2
(ii) <i>Coscienza come esperienza</i>	3
(iii) <i>Coscienza come mente</i>	3
TEORIE SULLO STATO DI COSCIENZA	4
(i) <i>Le teorie neurobiologiche</i>	5
(ii) <i>Le teorie di elaborazione delle informazioni</i>	6
(iii) <i>Le teorie sociali</i>	8
CORRELATI ANATOMO-FUNZIONALI DELLO STATO DI COSCIENZA	8
(i) <i>Elettrofisiologia del cervello</i>	8
(ii) <i>Il controllo dello stato di coscienza</i>	10
(iii) <i>Le alterazioni dello stato di coscienza</i>	15
ENTITA' DEL FENOMENO	17
OBIETTIVI	21
LISTA DELLE PUBBLICAZIONI E CONTRIBUTI SCIENTIFICI	23
ESPERIMENTO 1	25
INTRODUZIONE	25
METODI	30
<i>Pazienti</i>	30
<i>Valutazione della disabilità</i>	31
<i>Registrazione ERP</i>	32
<i>Procedura</i>	33
<i>Analisi statistica</i>	35
RISULTATI	35
DISCUSSIONE	39
ESPERIMENTO 2	43
INTRODUZIONE	43
METODI	47
<i>Pazienti</i>	47
<i>Procedura di stimolazione</i>	48
<i>Disegno sperimentale</i>	50
<i>Registrazione dei dati EEG</i>	51
<i>Analisi dei dati EEG</i>	52
RISULTATI	53
<i>Effetti clinici e sulla reattività EEG</i>	53
<i>Effetti neurofisiologici: reattività EEG</i>	53
<i>Effetti neurofisiologici: soglia motoria e ampiezza dei PEM</i>	54

CASE REPORT	59
ESPERIMENTO 3	69
PRIMA FASE: LOCALIZZAZIONE DELL'AREA DI STIMOLAZIONE	69
INTRODUZIONE.....	69
METODI	72
<i>Protocollo di stimolazione e registrazione EEG.....</i>	<i>73</i>
<i>Analisi EEG.....</i>	<i>74</i>
RISULTATI.....	75
DISCUSSIONE.....	77
SECONDA FASE: PROGETTO REGIONALE RSF 288/08	79
INTRODUZIONE.....	79
METODI	81
<i>Pazienti</i>	<i>81</i>
<i>Trattamento.....</i>	<i>83</i>
<i>Registrazione EEG.....</i>	<i>87</i>
RISULTATI.....	89
<i>Correlati clinici.....</i>	<i>89</i>
<i>Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione somatosensoriale</i>	<i>89</i>
<i>Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione a corrente elettrica continua</i>	<i>92</i>
<i>Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione magnetica transcranica</i>	<i>94</i>
DISCUSSIONE.....	99
CONCLUSIONI	107
BIBLIOGRAFIA	111
ALLEGATO 1.....	131
ALLEGATO 2.....	133
ALLEGATO 3.....	135

INTRODUZIONE

L'ultimo decennio ha visto una crescente ondata d'interesse per la "coscienza", testimoniata da un aumento del numero di pubblicazioni, nuove riviste e meeting scientifici (Penrose, 1994; Metzinger, 1995; Chalmers, 1996; Weiskrantz, 1997, Hurley, 1998; Jasper e coll., 1998; Rose, 1998; Velmans, 2000). Il "problema della coscienza" è stato identificato come una sfida intellettuale in diverse discipline, dalle neuroscienze di base alla psicologia, alla filosofia, sebbene le opinioni varino ampiamente.

Diversi fattori contribuiscono a spiegare l'attuale interesse verso lo studio della coscienza. Le tecniche di psicologia fisiologica, neuropsicologia umana e, di recente, di imaging funzionale stanno rivelando correlazioni squisitamente dettagliate sui processi neurali e le caratteristiche dell'esperienza cosciente. Il riconoscimento delle capacità inconsce o "implicite" che possono esercitare un'influenza sul comportamento, come ad esempio il fenomeno della visione cieca (o blindsight), ha aperto la strada alla distinzione di quali siano i substrati neurali di attività conscia ed inconscia nel cervello.

Questo è un momento opportuno per esaminare i progressi nel campo dello studio della coscienza poiché almeno una parte del problema è legato alle ambiguità del termine.

IL CONCETTO DI COSCIENZA

Il termine coscienza parola ha la sua radice latina in *conscio*, formata dalla desinenza *cum*, che significa “con”, e *scio*, che significa “conoscere”. Nel suo significato originale latino, “essere consapevoli di qualcosa” significava condividere la conoscenza di quel qualcosa con qualcun altro, o con se stessi. In questo senso *conscientia* era, semplicemente, la conoscenza.

(i) Coscienza come stato di veglia

Si possono ad oggi distinguere tre tipi di significato per il termine coscienza.

Nella pratica neurologica di tutti i giorni, la coscienza è generalmente identificata con lo stato di veglia, e le capacità di percepire, interagire e comunicare con l'ambiente e con gli altri nel modo integrato che la veglia implica normalmente. La coscienza, in questo senso, è una questione di grado: la gamma di stati coscienti si estende dalla veglia, al sonno, allo stato di coma. Questi stati possono essere definiti oggettivamente, utilizzando alcuni criteri di comportamento come quelli forniti da scale di valutazione come la Glasgow Coma Scale (Teasdale e Jennett, 1974), dove si parla di diminuzione, declino, decadenza e recupero di coscienza. Essere coscienti secondo questa visione significa essere svegli, eccitati, o vigili.

(ii) *Coscienza come esperienza*

La coscienza è il contenuto di esperienza da un momento all'altro: come ci si sente ad essere una determinata persona, in un preciso momento (Nagel, 1979). Questo secondo significato del termine coscienza è più introspettivo del primo. Esso sottolinea la dimensione qualitativa e soggettiva dell'esperienza. Diversi autori hanno cercato di caratterizzare le proprietà generali della coscienza (James, 1890; Greenfield, 1998; Tononi e Edelman, 1998). Vi è un ampio consenso sulle caratteristiche fondamentali della coscienza: il suo carattere personale, che coinvolge un soggetto cosciente con un punto di vista necessariamente limitato; i suoi contenuti che si presentano stabili per brevi periodi e tipicamente variabili per lunghi intervalli, ma in ogni caso continui nel tempo, nel senso che la memoria normalmente permette di collegare la coscienza del presente con la coscienza del passato; la sua selettività, con potenziali contributi di ciascuno dei sensi, e da tutti i principali processi psicologici, tra cui pensiero, emozione, memoria, immaginazione, linguaggio e pianificazione delle azioni.

(iii) *Coscienza come mente*

Facendo riferimento al latino di *conscientia*, ogni stato mentale con un contenuto proposizionale può essere definito come cosciente, per esempio il credo, la speranza, la paura, l'intenzione, l'aspettativa, il desiderio. Accanto al significato di "coscienza" si è instaurato il concetto di "coscienza di sé". Si può definire un individuo come auto-cosciente se è in grado di

rispondere agli stimoli che agiscono su di esso direttamente, oppure modifica il suo comportamento in modo tale che vi sia una presa di coscienza delle proprie azioni (Beninger e coll., 1974).

Gli scimpanzé e gli oranghi, ma non le scimmie, in comune con i bambini di età superiore a 18 mesi, presentano la capacità di riconoscersi allo specchio (Gallop, 1970). Questa capacità implica il possesso di un rudimentale concetto di sé.

Tuttavia la coscienza di sé può esser riferita alla conoscenza del contesto sociale e culturale che ci dà forma: così l'idea del sé include non solo i propri corpo e mente, ma l'appartenenza ad una comunità culturale e linguistica, una professione, un contesto familiare. In questo senso, l'auto-coscienza si evolve per tutta la vita.

TEORIE SULLO STATO DI COSCIENZA

La rinascita della ricerca empirica sullo stato di coscienza ha stimolato diversi studi verso la conoscenza dei suoi meccanismi. Alcuni ricercatori si sono concentrati sui compiti che i processi consci possono eseguire, in genere con riferimento alle funzioni della coscienza sul controllo del comportamento, altri hanno affrontato le possibili origini e ruoli sociali della coscienza. Questi approcci non si escludono a vicenda.

(i) Le teorie neurobiologiche

La maggior parte delle teorie neurobiologiche sulla coscienza dà per assodato che le strutture nel nucleo tronco encefalico superiore svolgano un ruolo critico nell'*arousal*, e che l'attività corticale e del talamo fornisce gran parte del contenuto della coscienza. La maggior parte di queste teorie parte anche dal presupposto che il correlato neurale della coscienza si tratti di un temporaneo assemblamento funzionale di cellule neuronali, un'ampia struttura composta da cellule corticali e nel diencefalo in grado di agire per breve tempo come un sistema chiuso, agevolando altri sistemi (Hebb, 1949).

Questo approccio porta molte perplessità su quanto grande debba essere un network per dare origine alla coscienza, o quali neuroni, regioni corticali o connessioni esso debba coinvolgere.

Una recente teoria si fonda su tre principi fondamentali: che la coscienza nasce dalla rapida integrazione di una grande quantità di informazioni all'interno di un nucleo dinamico di elementi fortemente interagenti; che interconnessioni reciproche tra regioni del sistema talamo-corticale mediano questa rapida integrazione; e che l'insorgenza della "coscienza primaria", la costruzione del nostro mondo percettivo multimodale, dipende dalla integrazione di elaborazioni sensoriali con la memoria di esperienze acquisite precedentemente (Tononi e Edelman, 1998). Questa teoria sottolinea l'importanza di una complessa integrazione di sottosistemi talamocorticali che appaiono essere funzionalmente separati, ma altamente interattivi.

Il candidato fisiologico più riconosciuto per un ruolo chiave nella coscienza è l'attività neuronale sincronizzata nella banda frequenza gamma, a

circa 35-45 Hz. Questa ipotesi è supportata da numerosi studi che hanno evidenziato una diffusa attività di sincronizzazione gamma al magnetoencefalogramma (MEG) nello stato di veglia e di sonno REM (Linas e Ribary, 1993) ed ai potenziali evocati uditivi, usati come marker dello stato di coscienza in studi sulla profondità dell'anestesia (Munglani e coll., 1993).

Engel e Singer hanno proposto che la sincronizzazione possa svolgere un ruolo in tutti i principali processi che sottendono la coscienza: *arousal*, segmentazione sensoriale, attenzione selettiva, memoria di lavoro, e anche nei processi cognitivi superiori, come la motivazione, la pianificazione delle azioni, e l'elaborazione simbolica (Engel e coll., 2000). Tutti gli autori sembrano essere uniti nell'affermare che la sincronizzazione selettiva dell'attività neuronale sia un fenomeno necessario per la coscienza.

(ii) Le teorie di elaborazione delle informazioni

Se la coscienza ha una funzione biologica, dovrebbe manifestarsi nel comportamento. Molte azioni possono essere eseguite con parziale o nessuna attenzione cosciente. Per contro, le circostanze che mobilitano l'attenzione cosciente tendono a coinvolgere nuove esperienze o eventi imprevedibili. Queste osservazioni sono la base della maggior parte delle teorie funzionali della coscienza.

Queste teorie tendono a seguire l'esempio di William James che associa la coscienza con l'attenzione selettiva e la memoria primaria o di lavoro (Velmans, 2000). L'attivazione di circuiti coinvolti nella memoria di lavoro favorisce l'automatizzazione, la velocità e l'alta capacità di elaborazione tra i

moduli inconsci della funzione psicologica rispetto al controllo volontario, relativamente lento. Teorie di elaborazione delle informazioni di questo tipo sono in accordo con l'opinione ampiamente diffusa che la coscienza sia legata all'insorgenza di modelli flessibili di comportamento appreso da modelli istintivi più rigidi di risposta.

Shallice propose un modello alternativo che enfatizza anche il ruolo della coscienza nell'integrare le attività di sottosistemi psicologici (Shallice, 1988). Secondo tale teoria, i sistemi di livello superiore influenzano, piuttosto che controllano, i processi di livello inferiore. I sistemi di livello superiore sono legati al linguaggio, alla memoria episodica, alla selezione delle azioni o la definizione degli obiettivi. La coscienza sembrerebbe insorgere solo quando la stessa informazione è rappresentata contemporaneamente in due o più sistemi di livello superiore. I contenuti della coscienza corrispondono alle informazioni che vengono scambiate tra questi sistemi. Questo presuppone che la coscienza sia un fenomeno che gioca un ruolo importante nell'indirizzare il nostro comportamento durante la veglia. Questa ipotesi è stata messa in discussione, per motivi concettuali ed empirici. Così, ad esempio, Libet suggerì che la consapevolezza dell'intenzione di agire è il risultato piuttosto che la causa di processi preconsoci che alla fine si traducono in azione (Libet, 1996). Comprendere la coscienza impone di guardare il funzionamento sociale del cervello.

(iii) Le teorie sociali

Come visto in precedenza, la radice latina del termine “coscienza” si riferisce, alla conoscenza condivisa. Humphrey fornì un esempio di funzione sociale per la coscienza, suggerendo che lo scopo della coscienza è quello di permettere ad animali sociali di modellare l’un l’altro il proprio comportamento e di prevederlo (Humphrey, 1978).

CORRELATI ANATOMO-FUNZIONALI DELLO STATO DI COSCIENZA

Durante il secolo scorso, due principali fili conduttori hanno dato vita agli studi sullo stato di veglia: l'indagine dei correlati elettrofisiologici dello stato di coscienza e la scoperta che le strutture che regolano lo stato cosciente sono circoscritte nel tronco encefalico, nel talamo e nel prosencefalo basale.

(i) Elettrofisiologia del cervello

Durante il XIX secolo, numerosi scienziati studiarono i potenziali evocati sensoriali dal cervello di animali da esperimento (Brazier, 1961). Molti di questi scienziati notarono la presenza di attività elettrica spontanea sulla corteccia degli animali non stimolati, ma si dovette attendere fino al 1929 quando Hans Berger pubblicò le sue osservazioni sull’“Elettroencefalogramma (EEG) nell'uomo” (Berger, 1929). Sebbene la scoperta più importante di Berger fosse di dimostrare che l'attività spontanea poteva essere registrata dal cervello umano attraverso elettrodi extracranici, il suo contributo implicito fu il chiarire

le basi fisiche della coscienza. Il suo primo manoscritto si concluse, infatti, con una serie di domande che dovevano avviare un fertile programma di ricerca: come l'EEG veniva influenzato dalla stimolazione sensoriale, dal sonno, dall'attività intellettuale e da farmaci che alterano lo stato mentale?

Berger distinse due ritmi di veglia contrastanti: il ritmo alfa a 8-13 Hz, che caratterizza l'EEG spontaneo, generalmente registrato da elettrodi occipitali in un soggetto sveglio con gli occhi chiusi, ed il ritmo beta, che si verifica a frequenze maggiori di 13 Hz, che accompagna uno sforzo mentale. Fu presto scoperto che ritmi più lenti (onde teta a 4-7 Hz, e delta con frequenze inferiori di 3,5 Hz) ad elevata ampiezza caratterizzano gli stati di ridotta eccitabilità negli adulti. Il loro coinvolgimento ciclico nel sonno divenne evidente solo nel 1950, in particolare dal lavoro di Kleitman e dei suoi collaboratori.

Studi successivi aiutarono a definire più minuziosamente la distinzione tra sonno ad onde lente (sonno non-REM), associato ad un aumento progressivo di attività delta nell'EEG e la fase REM (rapid-eye movements), durante la quale le caratteristiche dell'EEG assomigliano a quelle dello stato di veglia. Sebbene solo la fase non-REM sia stata spesso considerata come uno stato di sincronizzazione elettrica, in contrasto con la desincronizzazione caratteristica delle fasi di veglia e sonno REM, recenti scoperte hanno rivelato la presenza di attività sincronizzata anche durante lo stato di veglia in bande di frequenza rapide gamma (35-45 Hz).

La scoperta di Berger ed i suoi successivi sviluppi si sono rivelati estremamente fruttuosi: i potenziali evocati sensoriali e cognitivi hanno dimostrato che la percezione, l'attenzione, l'attività intellettuale e la

pianificazione del movimento hanno tutti distintivi correlati elettrofisiologici sulla superficie del cranio (Kutas e Dale, 1997).

(ii) Il controllo dello stato di coscienza

Studi clinico-patologici sull'encefalite letargica eseguiti durante la prima guerra mondiale suggerirono che le strutture del tronco encefalico superiore e dell'ipotalamo posteriore mediano l'*arousal*. Successivamente Bremer confermò sperimentalmente questa ipotesi dimostrando che una sezione del cervello del gatto alla giunzione cervico-midollare non aveva alcun effetto sull'*arousal*, o sul ciclo sonno-veglia, mentre la sezione a livello mesencefalico portava ad uno stato simile al sonno profondo (Bremer, 1929). Bremer ipotizzò che questo deterioramento dell'*arousal* era il risultato di un'interruzione delle vie ascendenti sensoriali nel mesencefalo. In seguito emerse che le aree critiche non erano nelle vie sensoriali, ma piuttosto nella formazione reticolare del tronco encefalico e, probabilmente, nelle efferenze talamiche (Moruzzi e Magoun, 1949). Sebbene la formazione reticolare ascendente giochi un ruolo fondamentale nell'*arousal*, essa non è da considerarsi l'unico luogo in cui risiede la coscienza. Molte altre strutture appartenenti ad un complesso network neuronale ne sono coinvolte e le loro efferenze sono indirizzate al midollo spinale ed agli emisferi cerebrali (Fig. 1).

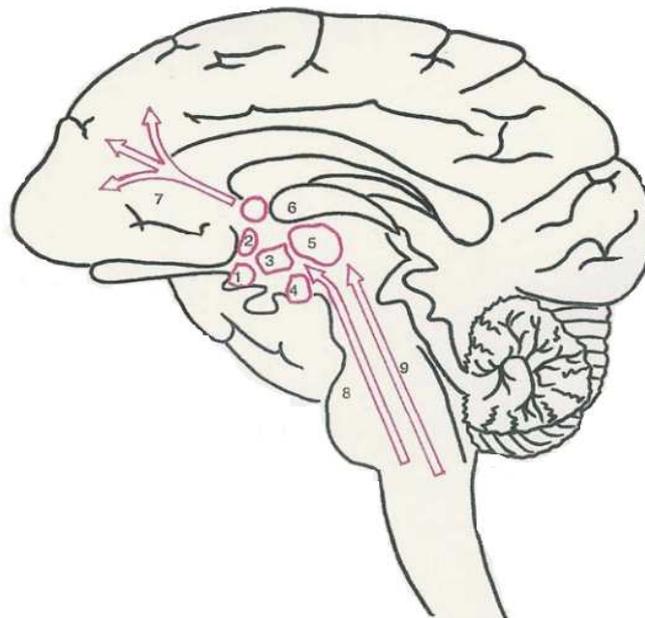


Fig. 1. Schema delle strutture cerebrali che ricoprono un ruolo chiave nella regolazione dei meccanismi di sonno e veglia. 1. Nucleo supraottico; 2, Nucleo preottico; 3, Ipotalamo; 4. Corpi mamillari; 5, Talamo; 6, Nucleo caudato; 7, Proiezioni frontali; 8, Rafe mesencefalico; 9, Sistema reticolare.

Studi sperimentali suggeriscono che le strutture che giocano un ruolo chiave nel mantenimento e modulazione dello stato di veglia siano: i nuclei colinergici nel tronco encefalico superiore e proencefalo basale; i nuclei noradrenergici, in particolare, il locus coeruleus, le proiezioni istaminergiche dall'ipotalamo posteriore, e probabilmente vie dopaminergiche e serotoninergiche del tronco encefalico (McCarley, 1999) (Fig. 2). Molte di queste vie agiscono sotto l'influenza del talamo, che può essere considerato come un relè sinaptico critico per la maggior parte delle vie sensoriali ed intracerebrali (Jones, 1998). La funzione di queste strutture attivanti non è, ovviamente, limitata al mantenimento della veglia. Esse sono di fondamentale

importanza per una vasta gamma di funzioni cognitive, tra cui l'umore, la motivazione, l'attenzione, l'apprendimento, la memoria e il movimento (Robbins e Everitt, 1993; Marrocco e coll., 1994).

Ad esempio, il nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo è emerso essere il "cronometro" della coscienza associando il ritmo sonno-veglia all'alternarsi del giorno e della notte attraverso l'afferenza da parte della via retino-ipotalamica (Kilduff e Kushida, 1999). Ancora, è nota l'importanza fondamentale dei nuclei colinergici a livello della giunzione ponto-mesencefalica, i nuclei laterodorsale tegmentale e peduncolo-pontino, nell'orchestrare i fenomeni di sonno REM, vale a dire l'attivazione EEG, onde ponto-genicolo-occipitali, movimenti oculari rapidi e atonia muscolare.

Recenti studi di neuroimaging funzionale sull'attività cerebrale regionale dei tre principali stati comportamentali nell'uomo (sonno profondo, sonno REM e veglia) hanno confermato ed esteso le conclusioni tratte da esperimenti su animali ed osservazioni cliniche. Il metabolismo globale del glucosio cerebrale si riduce di circa il 20% durante il sonno non-REM, per ritornare, o addirittura superare i livelli di veglia, durante la fase REM (Heiss e coll., 1985; Buchsbaum e coll., 1989). Durante il sonno profondo, il flusso di sangue regionale si riduce, in proporzione alla quantità di onde lente all'EEG, nel tronco encefalico rostrale, talamo, prefrontale e corteccia cingolata. Nel sonno REM, il flusso di sangue regionale aumenta nel tronco encefalico rostrale, nel talamo e nelle regioni limbiche, ma si riduce nella corteccia cingolata prefrontale e posteriore, ed in alcune regioni della corteccia parietale (Macquet e coll., 1996). Le variazioni del livello di *arousal* durante la veglia, ad esempio durante lo svolgimento di compiti di *reaction time* visivi o sensoriali, sembrano

correlare con i livelli di attività di alcune strutture del mesencefalo e del talamo che regolano lo stato cosciente (il mesencefalo tegmentale ed i nuclei intralaminari del talamo. Infine, vi è la prova che la perdita di coscienza indotta da alcuni anestetici sia associata alla depressione selettiva delle funzioni del talamo, che modula i meccanismi di anestesia e sonno (Fiset e coll., 1999; Alkire, 2000).

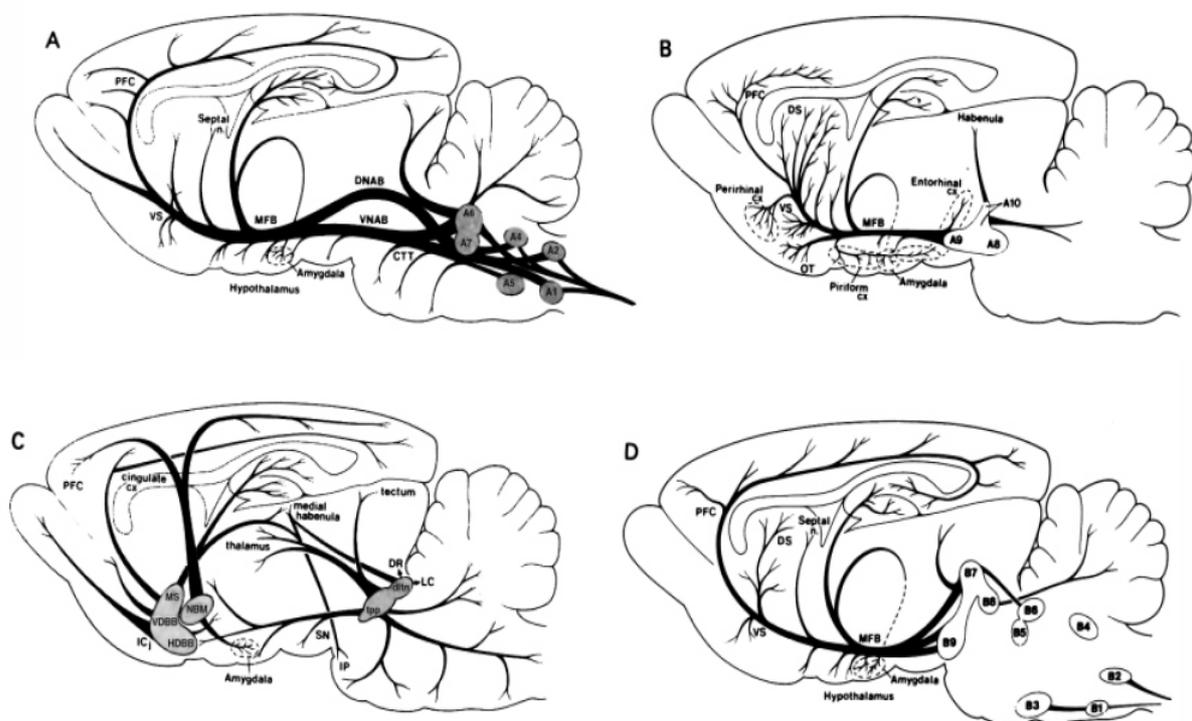


Fig. 2. Schema del sistema attivante (da Robbins e Everitt, 1993, MIT Press, USA): (A) mostra l'origine e la distribuzione delle vie noradrenergiche centrali nel cervello del ratto, (B) le vie dopaminergiche; (C) le vie colinergiche, (D) le vie serotoninergiche. CTT, tratto tegmentale centrale; dltn, nucleo tegmentale dorso laterale; DNAB, fascio ascendente noradrenergico dorsale; DR, rafe dorsale; DS, corpo striato dorsale; HDBB, banda diagonale di Broca; Icj, isole di Calleja; IP, nucleo interpeduncolare; LC, locus ceruleus; MS, setto mediale; NBM, nucleo magno cellulare basale (Meynert); OT, tubercolo olfattivo; PFC, corteccia prefrontale; SN, substantia nigra; tpp, nucleo tegmentale peduncolo pontino; VDBB, nucleo limbico verticale della banda diagonale di Broca; VNBA, banda ascendente noradrenergica ventrale; VS, striato ventrale.

Sostanziali progressi sono stati fatti verso la conoscenza delle caratteristiche comportamentali ed elettriche dei tre principali stati di coscienza (veglia, sonno non-REM e REM).

Nello stato di veglia i neuroni talamo-corticali sono tonicamente depolarizzati da input colinergici, noradrenergici ed istaminergici da parte del tronco encefalico e dell'ipotalamo, che bloccano la conduttanza iperpolarizzante del potassio (McCarley, 1999; Steriade, 1999). Questo induce una risposta nelle cellule talamo-corticali, permettendo così la trasmissione fedele dei segnali afferenti al talamo.

Nel sonno non-REM, la riduzione dell'input depolarizzante induce una contrastante risposta che dipende da una bassa conduttanza per il calcio, che predispone queste cellule a scariche ripetitive durante l'iperpolarizzazione. La simultanea disinibizione del nucleo reticolare del talamo durante il sonno, a seguito della riduzione di input inibitori colinergici dal tronco encefalico, permette di esercitare una inibizione GABAergica sincronizzata delle cellule talamo-corticali, che dà luogo alle spindles caratteristiche della fase 2 del sonno.

Un'ulteriore iperpolarizzazione, associata al sonno più profondo, consente alle cellule del talamo di partecipare alla formazione delle oscillazioni delle onde lente cui contribuiscono singoli network, cellule cortico-talamiche e neuroni del nucleo reticolare. La riduzione degli input eccitatori non specifici alla corteccia, così come gli effetti che si verificano principalmente a livello del talamo, sono responsabili della generazione di questi ritmi lenti.

(iii) Le alterazioni dello stato di coscienza

Il ruolo chiave del tronco encefalico e del talamo nel mantenimento della veglia aiutano a spiegare le patologie legate all'*arousal* che seguono danni strutturali nel cervello.

Il coma è uno stato di permanente incoscienza ad "occhi chiusi", in assenza di un ciclo sonno-veglia (Plum e Posner, 1982; Plum, 1991; Schiff e Plum, 2000). Varia in grado da lieve a profonda mancanza di responsività, ed è associato ad una riduzione relativamente variabile del metabolismo cerebrale. Il coma è il risultato di una lesione emisferica diffusa o focale del tronco encefalico o del talamo e generalmente è uno stato di transizione che evolve verso il pieno recupero, la morte cerebrale o uno stato di coscienza alterato associato al recupero del ciclo sonno-veglia.

La morte cerebrale (Pallis e Harley, 1996) implica la perdita irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo.

Lo stato vegetativo, descritto da Jennett e Plum nel 1972 (Jennett e Plum, 1972; Multi-Society Task Force PVS, 1994; Zeman e coll., 1997), rappresenta, in un certo senso, una situazione opposta rispetto alla morte cerebrale: in questa condizione, caratterizzata da una "veglia senza coscienza", i pazienti riacquistano il loro ciclo sonno-veglia, e possono essere svegliati da stimoli dolorosi o salienti, ma non mostrano segni inequivocabili di percezione cosciente o di azioni volontarie o tese a comunicare con l'ambiente circostante. La probabilità di recupero dallo stato vegetativo è maggiore per eziologie traumatiche che ipossico-ischemiche, e diminuisce all'aumentare dell'età di insorgenza. Dopo un mese, lo stato vegetativo è spesso definito

“persistente”, e nei pazienti in cui il recupero appare altamente improbabile può essere considerato “permanente”, anche se la permanenza non può essere prevista con certezza ed assume più i connotati di una probabilità. La patologia di base di solito comporta (i) diffusa lesione corticale, in genere, una necrosi laminare corticale, (ii) una lesione diffusa della sostanza bianca, in genere, danno assonale diffuso o leucoencefalopatia, oppure (iii) necrosi del talamo.

Talvolta, la diagnosi di stato vegetativo viene messa in dubbio a causa di errori terminologici o diagnostici.

Dal punto di vista della terminologia, lo stato vegetativo viene misdiagnosticato a causa dell'incertezza relativa alla natura della sindrome, di una inadeguata osservazione, del mancato confronto con i caregivers e dell'innegabile difficoltà nel riconoscere i primi segni di coscienza in pazienti con gravi deficit motori e cognitivi. Studi di fisiopatologia indicano che lo SV conduce effettivamente a gravi danni alle strutture che sottendono alla coscienza con una relativa conservazione delle strutture del tronco encefalico legate allo stato di veglia. Ancora, studi autoptici hanno rivelato che lo SV è indotto da un danno alla corteccia, alla materia bianca cerebrale, al talamo o alla combinazione di questi. Studi di neuroimaging hanno dimostrato una globale riduzione del metabolismo cerebrale fino al 40-60% sotto i livelli presenti durante anestesia, mentre il metabolismo del tronco encefalico è relativamente conservato. Laddove si può registrare attività corticale evocata, essa appare frammentaria, non integrata ai diversi networks che sembrano correlare con lo stato di coscienza. Un recupero della coscienza potrebbe

quindi essere legato ad un ripristino di connessioni corticali a lungo raggio precedentemente silenti (Laureys e coll., 2004).

Infatti, sebbene lo SV indichi un severo danno cerebrale, è possibile avere un recupero, e trovarsi di fronte ad una condizione di “stato di minima coscienza”, che comporta qualche prova coerente o incoerente di consapevolezza intellettiva, in presenza di una importante disabilità fisica e cognitiva.

La distinzione tra coma, morte cerebrale, stato vegetativo e stato di minima coscienza è fondamentale e moderatamente robusta nella pratica clinica, ma non è immune da errori pratici e teorici. A livello pratico, ci sono evidenti esempi che lo stato vegetativo sia spesso mal diagnosticato in pazienti che sono, di fatto, consapevoli di sé e dell'ambiente che li circonda (Childs e coll., 1993; Andrews e coll., 1996). Dal punto di vista teorico, rimane una questione aperta se i pazienti in stato vegetativo siano realmente del tutto inconsapevoli.

ENTITA' DEL FENOMENO

L'incidenza e la prevalenza dello SV sono in graduale crescita in tutti i paesi occidentali, di pari passo con i pr

ogressi della scienza medica ed, in particolare, con l'evoluzione delle tecniche rianimatorie.

Il numero di pazienti in stato vegetativo non è di semplice stima a causa delle difformità dei criteri di diagnosi, soprattutto in Italia, dove termini quali "coma apallico" e "coma vigile" vengono utilizzati ancora erroneamente (Andrews e coll., 1996; Bernat e Rottenberg, 2007).

Ciononostante, dati preliminari appartenenti ad un recente studio GISCAR (Gruppo Italiano per lo Studio delle Gravi Cerebrolesioni Acquisite e Riabilitazione) hanno messo in luce che gli stati vegetativi rappresenterebbero circa il 6% dei pazienti in dimissione dai reparti di Riabilitazione; in termini numerici, ciò starebbe a significare che vi sarebbero 6.000-10.000 SV ricoverati in strutture sanitarie. L'incidenza sembrerebbe ammontare a circa 1500 nuovi casi l'anno (DM 12.09.2005).

Tuttavia, i presenti dati non sono scevri da imprecisioni dovute al fatto che numerosi pazienti non vengono seguiti in servizi di riabilitazione e la loro destinazione è la più svariata, spesso in relazione alla Regione di provenienza (Unità dedicate, reparti ospedalieri, RSA, Case di Riposo, domicilio) (Mancuso, 2009).

Una causa della diversa destinazione dei pazienti sembra essere correlata all'eziologia dello SV. Vi è, infatti, una forte prevalenza di soggetti con cerebropatia anossica che accede direttamente ad una struttura di accoglienza non riabilitativa, con rapporto 3:1, rispetto ai vascolari, che vi accedono con rapporto 2:1 e ai traumatici che vengono ammessi totalmente alle strutture riabilitative (Consensus Conference Modena, 2000) Da ciò si

configura un'evidente anomalia di selezione che comporta grossolani errori nella stima del numero di pazienti in SV.

L'aspettativa di vita dei soggetti in SV è in progressivo aumento. Si è passati da una stima di 2-5 anni di sopravvivenza media riportata nella review della "Multi Society Task Force on PSV" statunitense del 1994, ai casi, non più così isolati, di sopravvivenza più prolungata, anche oltre i 10-15 anni dall'evento acuto. Tale incremento è riconducibile ad una migliore qualità delle cure e dell'assistenza fornita al paziente (Ministero della Salute, 2008).

Dando uno sguardo all'eziologia, ci si accorge che circa il 20% dei pazienti in SV è rappresentato dai traumi cranio-encefalici (TCE), che in Italia si stima abbiano un'incidenza pari a 300 nuovi casi all'anno per 100.000 abitanti (Dati ISTAT 1986). Tale numero è in aumento e rappresenta una delle cause principali di gravi lesioni neuromotorie e cognitivo-comportamentali tali da produrre severe disabilità.

OBIETTIVI

Sebbene in letteratura lo stato vegetativo sia per lo più descritto come una sindrome da decorticazione funzionale, studi di tomografia ad emissione di positroni (PET) e potenziali evento-correlati (ERP) hanno concordato che alcuni livelli di elaborazione corticale possano rimanere integri anche in pazienti in SV. Tuttavia, resta incerto se tali pazienti siano rappresentativi della popolazione o siano da considerarsi dei casi eccezionali.

Nel primo esperimento, ci siamo proposti di testare i livelli gerarchici di elaborazione delle informazioni in pazienti con gravi alterazioni della coscienza. Nello specifico, sono state formulate due ipotesi:

(1) che sia necessaria l'elaborazione di stimoli sensoriali semplici per poter elaborare stimoli più complessi; ciò significa che l'attività delle cortecce sensoriali primarie, che riflette meccanismi di elaborazione relativamente semplici, sia presupposto necessario per l'attivazione di aree corticali associative legate a processi più complessi (Howard, 2012; Kotchoubey, 2002;). Se questa ipotesi fosse vera, nei pazienti in SV dovrebbe essere possibile attivare solo aree con funzioni di elaborazione semplice.

(2) che, in un certo qual modo, le aree deputate a funzioni cognitive più complesse si attivino in maniera parzialmente indipendente dalle aree di attivazione primarie. In questo caso, anche i pazienti con diagnosi di stato vegetativo potrebbero essere in grado di elaborare stimoli più complessi.

A tale scopo, i potenziali evento-correlati risultano essere utili per evidenziare il livello di integrazione tra diverse aree deputate a funzioni cognitive superiori.

Negli esperimenti 2 e 3, l'obiettivo primario è stato di valutare l'efficacia di metodiche di stimolazione transcranica nel promuovere la regolazione di network cerebrali funzionalmente connessi, ma non costantemente attivi, che potrebbero influenzare il recupero di coscienza dei pazienti in stato di minima coscienza.

L'approccio generale degli studi da noi condotti e qui presentati ci restituiscono un panorama sulle dinamiche corticali che potrebbero predire lo stato cognitivo dei pazienti con gravi cerebrolesioni acquisite e alterazioni della coscienza. L'uso di appropriate procedure diagnostiche e terapeutiche per i pazienti in SV/SMC supporterà lo sviluppo delle più adatte cure mediche ed assistenza e garantirà una migliore qualità di vita dei pazienti e dei loro *caregiver*.

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

Manganotti P, Formaggio E, Storti SF, Fiaschi A, Battistin L, Tonin P, Piccione F, and **Cavinato M**. Effect of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on brain excitability in severely brain-injured patients in minimally conscious or vegetative state. In submission.

Cavinato M, Iaia V, Piccione F. Repeated sessions of sub-threshold 20-Hz rTMS. Potential cumulative effects in a brain-injured patient. Clin Neurophysiol. 2012;123:1893-5.

Cavinato M, Di Bono MG, Cisotto G, Genna C, Marangon M, Zorzi M, Piccione F. The effects of transcranial direct current stimulation on oscillatory brain activity in vegetative state: a preliminary study. Arch Ital Biol 2011;149(3):S29.

Cavinato M, Volpato C, Silvoni S, Sacchetto M, Merico A, Piccione F. Event-related brain potential modulation in patients with severe brain damage. Clin Neurophysiol. 2011;122:719-24.

Piccione F, **Cavinato M**, Manganotti P, Formaggio E, Storti SF, Battistin L, Cagnin A, Tonin P, Dam M. Behavioral and neurophysiological effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on the minimally conscious state: a case study. Neurorehabil Neural Repair. 2011;25(1):98-102.

ESPERIMENTO 1

INTRODUZIONE

La valutazione clinica della coscienza è a tutt'oggi una sfida aperta e di difficile risoluzione, a causa dell'inconsistenza dei comportamenti intenzionali da parte dei pazienti minimamente responsivi (Giacino e coll., 2002). Lo stato di minima coscienza (SMC) si differenzia dallo stato vegetativo (SV) per la presenza di una discernibile, anche se incostante, consapevolezza di sé e dell'ambiente circostante (Laureys e coll., 2004; Zeman, 2001; Bekinschtein e coll., 2009).

La diagnosi di SV e SMC è generalmente basata su un giudizio clinico. Tuttavia, l'interpretazione soggettiva della presenza di segni comportamentali è fonte di un'elevata percentuale di diagnosi errate. Andrews e coll. (1996) rilevarono che circa il 40% dei pazienti riferiti essere in stato vegetativo in realtà presentava quadri clinici correlati più propriamente allo SMC.

Un'informazione complementare più obiettiva del livello di coscienza in pazienti non responsivi può essere ottenuta da misure neurofisiologiche e di neuroimaging (Gawryluk e coll., 2010).

Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato l'utilità della tomografia ad emissione di positroni (Positron Emission Tomography, PET) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI) per valutare l'elaborazione cognitiva nei pazienti con alterato stato di coscienza. La maggior parte di tali studi ha rivelato la costante presenza di network cerebrali parzialmente integri nei

pazienti in SV, espressione di frammentari modelli comportamentali. Schiff e coll. (2002), utilizzando una combinazione di fMRI, PET e magnetoencefalografia (MEG), riuscirono ad identificare alcuni isolati moduli parzialmente funzionali nel cervello di cinque pazienti in SV. Altri studi con fMRI dimostrarono che anche alcuni processi semantici possono essere parzialmente conservati in presenza di gravi alterazioni della coscienza (Coleman e coll., 2007).

Tuttavia, solo sporadiche e contrastanti ricerche si sono focalizzate sui pattern di attivazione cerebrale in grado di discriminare i pazienti in SMC da quelli in SV. Boly e coll. (2004) studiarono il flusso ematico cerebrale in 5 pazienti in SMC e 15 pazienti in SV mediante PET ad ossigeno radio-marcato. In risposta a stimolazione acustica con suoni semplici, gli autori trovarono aree di attivazione spazialmente più grandi nei pazienti in SMC rispetto a quelli in SV, suggerendo una più ampia integrazione ed elaborazione degli stimoli uditivi da parte delle aree cognitive superiori. Al contrario, Fernandez-Espejo e coll. (2008) usarono la fMRI per confrontare le risposte cerebrali a stimoli linguistici e uditivi complessi in tre pazienti vegetativi e quattro pazienti minimamente coscienti e non trovarono correlazioni significative tra l'attivazione del cervello ed il livello di coscienza dei due gruppi.

Diversi studi hanno, inoltre, dimostrato l'utilità dei potenziali evento-correlati nel valutare i diversi livelli di coscienza (Donchin e coll., 1986). Generalmente, gli ERP sono utilizzati per valutare funzioni cognitive superiori come attenzione, memoria, linguaggio (Kotchoubey e coll., 2002; Connolly e D'Arcy, 2000). Essi rappresentano oscillazioni elettroencefalografiche evocate da particolari stimoli sensoriali e, grazie alla loro alta risoluzione temporale,

possono fornire un'indicazione in tempo reale del grado di disfunzione e dell'elaborazione delle informazioni corticali nei gravi disturbi della coscienza (Donchin and Coles, 1988).

Rispetto ai processi attenzionali, la mismatch negativity (MMN) è stata utilizzata come indicatore di un sistema automatico di rilevazione delle informazioni acustiche. La MMN è considerata una risposta automatica del cervello alla deviazione di uno stimolo da precedenti eventi ripetitivi e richiede una elaborazione completa delle caratteristiche fisiche di uno stimolo uditivo (Näätänen, 1990). La presenza di una MMN è considerata un indice prognostico positivo nei pazienti in stato di coma e la sua ampiezza sembra essere correlata con il recupero dallo SV alla coscienza (Fischer e coll, 2004, 2005; Daltrozzo e coll, 2007). Wijnen e coll. (2007) dimostrarono che un aumento improvviso dell'ampiezza della MMN precedeva la comparsa di risposte comportamentali finalizzate (*goal-directed*) in dieci pazienti in stato vegetativo.

Per quanto riguarda il linguaggio, la componente ERP N400 rappresenta l'individuazione di incongruenze fonologiche o semantiche. Schoenle e Witzke (2004) studiarono 120 pazienti con gravi danni cerebrali e riscontrarono che il 77% dei pazienti in SMC esibiva distinte capacità semantiche. Questi risultati suggeriscono che parziali processi semantici possono essere osservati più frequentemente in pazienti che manifestano segni di evidenti comportamenti *goal-directed*.

Per quanto riguarda la memoria, l'onda P300 sembra essere sensibile a diverse funzioni cognitive, come il riconoscimento ed il significato soggettivo di uno stimolo, e la memoria di lavoro (Donchin e coll., 1988;. Polich e coll.,

2007; Holeckova e coll., 2006). Johnson (1993) osservò che la genesi della P300 fosse da attribuire a molte specifiche unità corticali di elaborazione delle informazioni che costituiscono un network parallelo distribuito in tutta la corteccia cerebrale ed il talamo. Per questo motivo, la componente P300 è probabilmente l'indicatore più idoneo delle funzioni cognitive superiori e probabilmente della coscienza (Kotchoubey, 2005).

Diversi studi hanno confermato l'utilità della P300 evocata da toni devianti di prevedere il risveglio e l'esito favorevole da coma e SV (Faran e coll., 2006; Guérit e coll., 1999; Fisher e coll., 2004). Tuttavia il numero di pazienti che mostra la presenza di una P300 in risposta a toni puri è piuttosto limitato.

La possibilità di osservare più robuste ed affidabili risposte ERP in pazienti con alterato stato di coscienza sembra essere maggiore con l'uso di complessi stimoli salienti, come il nome proprio del paziente in un paradigma oddball (Laureys e coll., 2004b; Perrin e coll., 2006; Fischer e coll., 2010). A sostegno di questa ipotesi, Kotchoubey e coll. (2001) confrontarono le forme d'onda P300 di 33 pazienti in SV in risposta a diversi livelli di complessità di stimolo uditivo. Gli autori trovarono che la P300 poteva essere registrata più facilmente dopo toni complessi che dopo toni puri. Kotchoubey affermò che molti pazienti non responsivi sono in grado di elaborare stimoli complessi attivando aree corticali più estese di quelle che sarebbero invece coinvolte durante l'elaborazione di stimoli più semplici. In un recente studio, Perrin e coll. (2006) confrontarono le P300 in risposta al nome proprio in cinque pazienti in SV, sei pazienti in SMC e quattro pazienti con sindrome locked-in. Gli autori osservarono la presenza di una P300 in tutti i pazienti in SMC e

locked-in ed in tre dei cinque pazienti vegetativi e conclusero che alcuni processi semantici e linguistici possono essere conservati anche nello SV. Nessuna differenza fu osservata nelle caratteristiche della componente ERP evocata nei tre gruppi di pazienti.

Nel presente studio, abbiamo applicato tre paradigmi con diversi livelli di complessità tra cui toni puri, il nome proprio del soggetto contro tono puro ed il nome proprio del soggetto contro altri nomi propri "neutrali" per evocare gli ERP in undici pazienti in SV, sei pazienti in SMC e 10 controlli sani.

Lo scopo principale dell'esperimento era valutare se la componente ERP P300 potesse essere considerata un marcatore elettrofisiologico in grado di: (i) discriminare diversi livelli di elaborazione cognitivo-semantica e (ii) differenziare i pazienti in SMC da quelli in SV. Poiché la validità della diagnosi di stato vegetativo è estremamente variabile, ipotizzavamo di osservare la presenza di una P300 intatta in una minoranza di pazienti SV. Ciò poteva dimostrare la presenza di diagnosi errate. Una diagnosi differenziale accurata può avere un effetto importante sul processo decisionale in materia di assistenza, servizi e pianificazione della riabilitazione di tali pazienti.

In risposta, invece, alla complessità dello stimolo uditivo, si partiva dal presupposto di osservare una P300 in risposta ai toni puri (*Sine Tone*, ST) ed al nome del soggetto (*Subject's Own Name*, SON) in tutti i pazienti in SMC e in una minoranza di pazienti in SV, ed una P300 ad un livello superiore di complessità di stimolo (*Other First Names*, OFN) nei pazienti con SMC, ma non nei pazienti più gravi.

METODI*Pazienti*

Nel presente studio, furono arruolati diciassette pazienti con grave cerebrolesione (Tab.1) e dieci volontari sani (6 donne; età media 40 ± 9.2) bilanciati per età. I pazienti entrarono nello studio dopo una media di 8.5 mesi (range: 1.2-15.6 mesi) dall'evento lesivo ed incontravano tutti i criteri internazionali per la diagnosi dello SV e SMC (Multisociety Task Force, 1994). I partecipanti con condizioni cliniche non stabili, o altre patologie come insufficienza cardiaca o polmonare, o precedente storia di disturbi neurologici, audiologici e psichiatrici vennero esclusi dallo studio. Durante il periodo di registrazione degli ERPs, nessun farmaco psicotropo fu somministrato ai pazienti.

Tutti i partecipanti mostravano normali o lievemente rallentate risposte del tronco encefalico. I potenziali somatosensoriali ottenuti dalla stimolazione del nervo mediano al polso mostravano la presenza di risposte della corteccia somatosensoriale primaria (N20) in tutti i pazienti classificati come SMC, e risultarono assenti in 4 di 11 pazienti in SV.

Paziente./ sesso/ età (anni)	Diagnosi	DRS	Causa	Correlati MRI	P300
1/F/43	SV	25	Arresto cardiorespiratorio	Edema frontale	+
2/F/76	SV	23	Arresto cardiorespiratorio	Atrofia diffusa	+
3/M/29	SV	25	Emorragia cerebrale	Emorragia temporale e talamica destra	+
4/M/35	SV	24	Trauma cranico	Contusioni frontali bilaterale, idrocefalo	+
5/F/56	SV	24	Emorragia cerebrale	Emorragia parietale e occipitale destra, idrocefalo	+
6/F/42	SV	24	Arresto cardiorespiratorio	Lesioni frontali bilaterali, idrocefalo	-
7/M/63	SV	24	Trauma cranico	Lesioni corticali temporale sinistra e frontale destra	-
8/F/38	SV	25	Emorragia cerebrale	Lesioni temporale e parietale sinistra, idrocefalo	-
9/F/27	SV	24	Trauma cranico	Lesioni frontali bilaterali e temporo-parietali	-
10/M/23	SV	25	Emorragia cerebrale	Emorragia frontale, parietale e talamica destra	-
11/M/22	SV	25	Trauma cranico	Emorragia temporale e parietale sinistra	-
12/M/40	SMC	20	Trauma cranico	Lesioni frontali, temporali e parietali bilaterali	+
13/F/70	SMC	19	Emorragia cerebrale	Emorragia temporale e parietale bilaterale	+
14/F/34	SMC	21	Tumore cerebrale	Angiona cavernoso mesencefalico	+
15/M/45	SMC	21	Emorragia cerebrale	Emorragia temporo-parietale destra	+
16/F/17	SMC	19	Arresto cardiorespiratorio	Edema temporo-parietale bilaterale	+
17/F/52	SMC	18	Trauma cranico	Contusioni frontali bilaterali	+

Tab. 1. Descrizione delle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti.

Valutazione della disabilità

La disabilità dei pazienti fu valutata mediante la Disability Rating Scale (DRS) (Rappaport e coll., 2004) (Allegato 1). La DRS delinea otto aree funzionali che includono: i criteri della Glasgow Coma Scale (apertura degli

occhi, miglior risposta verbale e motoria), una stima della capacità cognitiva per la cura della propria persona suddivisa in tre aree (nutrizione, pulizia e cura), una scala di funzioni generali (livello di autonomia fisica e cognitiva) ed una stima dell'impiegabilità del soggetto. Il punteggio totale della scala è di 30 punti, dove un valore maggiore indica una più grave disabilità.

Ogni paziente arruolato fu classificato secondo le categorie della scala DRS: 0, nessuna disabilità; 1, lieve; 2-3, parziale; 4-6 moderata; 7-9 moderatamente severa; 10-16, severa; 17-21, estremamente severa; 22-24, stato vegetativo; 25-29 stato vegetativo estremo.

Sulla base del punteggio della scala DRS al reclutamento, i pazienti vennero suddivisi in due gruppi. Il primo gruppo consisteva di 11 pazienti con una $DRS \geq 22$ (stato vegetativo e stato vegetativo estremo). Questi pazienti non erano in grado di eseguire comandi semplici e non mostravano alcuna interazione con l'ambiente circostante. Il secondo gruppo, composto da 6 pazienti con una DRS inferiore a 22, potevano essere considerati in SMC poiché presentavano alcuni segni di comportamenti coscienti, anche se incostanti.

Registrazione ERP

Tutti i pazienti parteciparono all'esperimento sedendo sulla propria carrozzina o su una sedia in una stanza insonorizzata.

I potenziali furono registrati tramite 4 elettrodi in Ag/AgCl posti sulla linea mediana dello scalpo (Fz, Cz, Pz, Oz) e T3-T4, in accordo con il sistema internazionale 10-20, riferiti ai lobi auricolari con la terra posizionata sulla

fronte (NeuroScan Amplifier, Compumedics Neuroscan). Altri elettrodi furono posti al canto esterno dell'occhio e sopra l'orbita dell'occhio di destra per la registrazione bipolare dell'attività elettrooculografica (EOG).

I dati furono digitalizzati ad una frequenza di campionamento di 1000Hz e filtrati con un filtro passa-banda 0.15-70 Hz. È stato applicato un filtro notch per eliminare le frequenze centrate a 50 Hz. I dati EEG furono successivamente segmentati in epoche di 1200 ms, includendo 200 ms di linea di base pre-stimolo. Le epoche che includevano segnali di ampiezza superiore a $\pm 90 \mu\text{V}$ furono eliminati. Dopo l'averaging delle tracce, venne applicato un ulteriore filtraggio passa basso digitale a 30 Hz.

La componente precoce N100 venne definita come il maggior picco negativo entro una finestra di latenza compresa tra 100 e 200 ms. La componente P300 fu definita come il maggior picco positivo compreso tra 250 e 500 ms per il paradigma ST e tra 250 ed 800 ms per gli altri due paradigmi (SON e OFN).

Procedura

Furono applicate tre condizioni di stimolo: il paradigma a toni puri (ST), il paradigma nome proprio del soggetto (SON) ed il paradigma Altro Nome (OFN). In ogni blocco, la stimolazione venne erogata binauralmente attraverso cuffie, all'intensità di 90 dB HL, con un intervallo interstimolo pseudocasuale di 1,2-1,4 sec. Tutte le condizioni di stimolo consistevano di due sequenze di 100 stimoli contenenti eventi rari devianti presentati all'interno di una stringa regolare di stimoli standard con la probabilità di apparizione del 20%. Per

ciascun trial di registrazione, gli stimoli devianti venivano presentati 20 volte in un ordine casuale in modo tale che il numero totale di stimoli rari fosse almeno 40.

Ai partecipanti veniva chiesto di contare gli stimoli rari, sebbene non vi fosse alcun segno comportamentale di comprensione da parte dei pazienti in SV o SMC.

Nel paradigma ST, ai partecipanti venivano presentati stimoli rari che comprendevano toni puri a 2.000 Hz, casualmente inseriti in una sequenza di stimoli frequenti a 1000 Hz. I toni avevano una durata di 100 ms.

Il paradigma SON consisteva nel nome del partecipante, come stimolo deviante, e toni puri come stimoli standard. Il nome proprio veniva pronunciato dalla voce di una familiare di primo grado, digitalizzata e riprodotta binauralmente ad una intensità 90 dB di pressione sonora. La durata media del paradigma era di 610 ± 68 ms, mentre i toni di 1000 Hz avevano durata di 100 ms.

Il paradigma OFN consisteva nel nome del soggetto esaminato, come stimolo deviante, e tre altri nomi propri come stimoli di controllo. Solo il nome del soggetto variava per ogni partecipante, gli altri nomi propri si mantenevano invariati. Tra gli altri nomi, furono esclusi i nomi che corrispondevano a parenti stretti o amici. Per ogni partecipante, i nomi vennero adeguati in modo tale che stimoli standard e rari avessero la stessa intensità e durata (610 ± 68 ms).

L'ordine di presentazione dei tre paradigmi fu controbilanciato tra pazienti e controlli sani.

Analisi statistica

Gli ERPs vennero mediati per ciascuno dei tre paradigmi, per un'epoca di 1200 ms che includeva un periodo pre-stimolo di 200 ms. Un aggiustamento della linea di base garantiva che tutte le forme d'onda ERP iniziassero dallo stesso voltaggio pre-stimolo. L'analisi statistica è stata eseguita sulle tracce medie di ogni partecipante, utilizzando il software SPSS. I parametri utilizzati ai fini dell'analisi statistica furono: le latenze dei picchi misurate dal tempo d'insorgenza dello stimolo e le ampiezze (misura picco-picco) dei potenziali evocati N100, P200, N200 e P300. È stato utilizzato un t test non parametrico a campioni indipendenti per confrontare i pazienti ed i gruppi di controllo per quanto riguardava i dati demografici. Ampiezze e latenze sono state invece testate con un'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute con 'gruppo' (controlli, SMC e pazienti SV) come fattore between e 'condizione' (paradigmi ST, SON e OFN) e 'distribuzione' (Fz, Cz, Pz) come fattori within. È stato adottato un test di Bonferroni per i confronti post-hoc ogni qualvolta i risultati raggiungevano la significatività a $P < 0.05$, dopo correzione di Geisser-Greenhouse.

RISULTATI

Nei controlli sani e nei pazienti in SMC, i tre paradigmi di stimolazione evocarono le classiche componenti ERP (N100, P200, N200 e P300). Nei pazienti in stato vegetativo, in tutti tranne 5, l'onda P300 non poteva essere riconosciuta in modo attendibile. La figura 3 illustra il *grand-average* degli

ERPs ottenuti dai soggetti sani, dai pazienti in stato di minima coscienza ed in stato vegetativo.

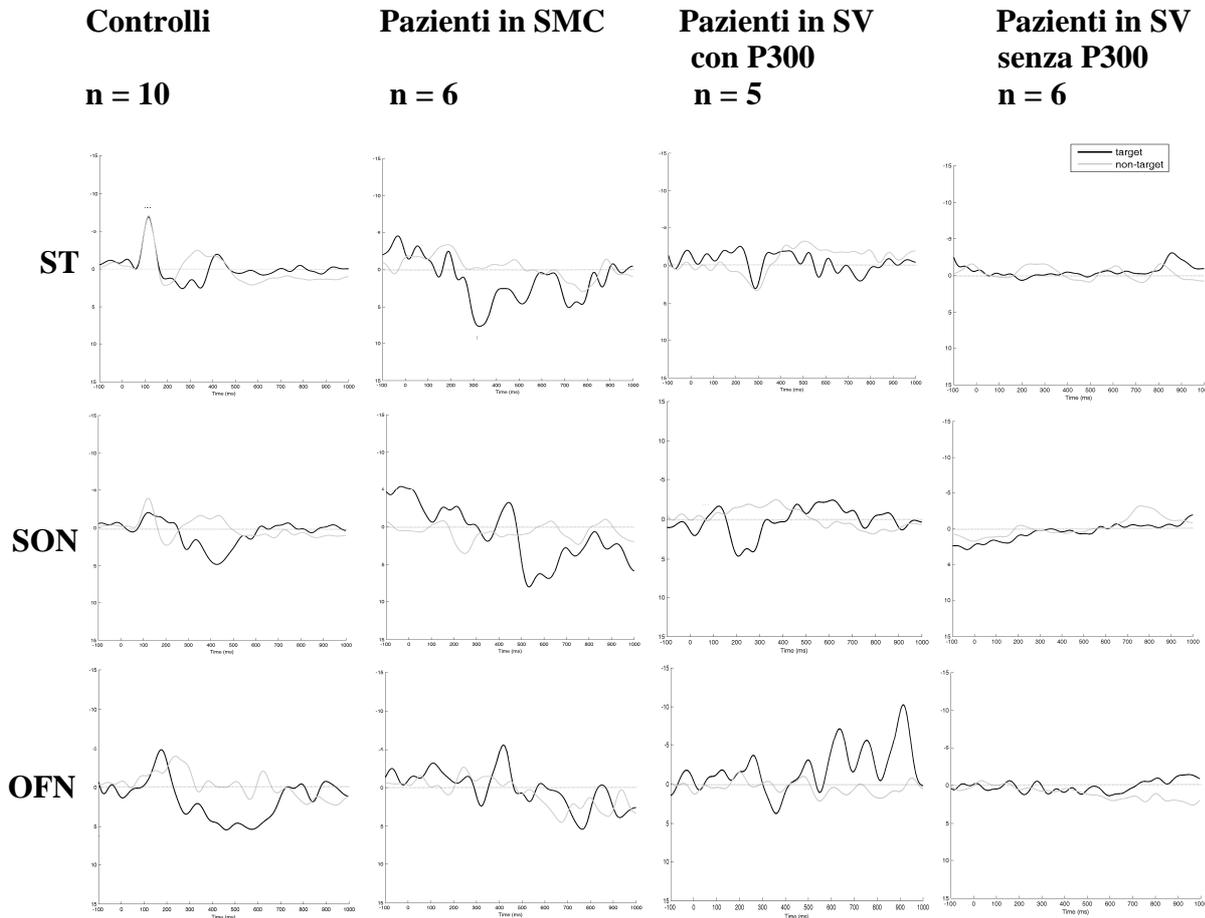


Fig. 3. Grande media dei potenziali evento-correlati registrati da Pz a seguito dei paradigmi con toni puri (ST), nome proprio del soggetto vs tono puro (SON), e nome proprio del soggetto vs altri nomi propri (OFN) in un gruppo di controlli sani, pazienti in stato di minima coscienza (SMC) ed in stato vegetativo (SV) con e senza risposte evocate.

Abbreviazioni: ST, Sine Tones; SON, Subject's Own Name; OFN, Other First Names.

L'analisi della varianza non ha mostrato alcun significativo effetto 'gruppo' sulle ampiezze degli ERP. Al contrario, è stata osservata una significativa interazione 'componente' x 'gruppo' x 'condizione' ($F_{2,19} = 6.38$, $P = 0.01$). Le analisi post-hoc hanno rivelato che l'ampiezza di N100 era

significativamente più alta in risposta alla ST per i controlli, rispetto ai pazienti in stato vegetativo ($F_{1,12} = 7.58, P = 0.02$). Inoltre, l'onda P300 tendeva ad essere più elevata in risposta al paradigma SON rispetto alla condizione ST nei pazienti in SV ed in SMC, ma i valori non hanno raggiunto la significatività statistica ($F_{2,12} = 3.74, P = 0.06$; $F_{1,12} = 4.84, P = 0.05$, rispettivamente). La Tabella 2 mostra i dati di ampiezze degli ERP registrati in Pz nei tre gruppi.

Il test ANOVA a misure ripetute ha rivelato un effetto 'condizione' ($F_{1,17} = 8.04, P = 0.007$), ma non un effetto 'gruppo' per le latenze degli ERPs. Come si può vedere nella Tabella 3, le interazioni 'gruppo' x 'condizione' e 'condizione' x 'componente' ($F_{3,40} = 2.99, P = 0.04$; and $F_{1,12} = 6.79, P = 0.02$, rispettivamente) indicavano un aumento delle latenze di N100 e P300 nei controlli e nei pazienti in SMC in risposta a diversi livelli di complessità dello stimolo. L'analisi post-hoc ha mostrato che le latenze dell'onda N100 erano significativamente ritardate nei controlli dopo OFN rispetto agli altri paradigmi ($F_{1,12} = 7.42, P = 0.03$). Per quanto riguarda le latenze dell'onda P300, il gruppo dei pazienti in SMC ha presentato risposte più ritardate ai paradigmi SON e OFN (rispettivamente, $F_{1,12} = 4.78, P = 0.04$ and $F_{1,12} = 6.71, P = 0.03$) rispetto ad ST, mentre i soggetti di controllo hanno mostrato un significativo aumento delle latenze dell'onda P300 in risposta ad OFN ($F_{1,12} = 15.03, P = 0.02$) ed un tendenziale aumento di latenza in risposta a SON ($F_{2,12} = 3.21, P = 0.05$).

	ST			SON			OFN		
	SV	SMC	Controlli	SV	SMC	Controlli	SV	SMC	Controlli
N100	-2.1 ± 1.8	-4.8 ± 4.4	-8.2 ± 4.4*	-6.1 ± 5.3	-3.8 ± 2.3	-5.8 ± 4.9	-6.5 ± 6.4	-3.1 ± 3.5	-6.1 ± 4.1
P200	1.3 ± 1.4	1.8 ± 3.2	2.5 ± 2.7	2.1 ± 4.6	1.8 ± 2.1	2.2 ± 3.0	2.3 ± 3.1	1.8 ± 3.0	2.3 ± 3.1
N200	-1.8 ± 1.5	-4.5 ± 6.2	-3.7 ± 2.7	-6.8 ± 3.8	-5.0 ± 2.9	-6.1 ± 5.1	-6.0 ± 3.5	-6.8 ± 4.3	-4.9 ± 2.9
P300	2.9 ± 1.9	5.7 ± 2.2	4.0 ± 5.3	4.6 ± 2.5	7.5 ± 4.4	4.9 ± 3.1	3.0 ± 2.4	5.3 ± 1.5*	4.2 ± 2.5

Tab 2. Ampiezze di N100, P200, N200, P300 in risposta ai paradigmi Sine Tones (ST), Subject's Own Name (SON) and Other First Name (OFN).

I dati sono indicati in termini di valori medi ± SD.

Abbreviazioni: SV, Stato Vegetativo, SMC, Stato di Minima Coscienza. * $P < .05$ vs SV.

	ST			SON			OFN		
	SV	SMC	Controlli	SV	SMC	Controlli	SV	SMC	Controlli
N100	149.2 ± 40.9	124.0 ± 28.6	110.2 ± 6.6	147.8 ± 54.6	161.4 ± 28.4	132.6 ± 6.5	146.8 ± 29.2	153.2 ± 54.4	159.4 ± 27.4*
P200	206.8 ± 65.9	208.0 ± 36.9	180.6 ± 29.8	213.2 ± 106.3	249.0 ± 30.4	214.0 ± 24.3	213.2 ± 62.9	249.0 ± 30.4	214.0 ± 24.3
N200	255.0 ± 73.8	271.4 ± 80.2	235.0 ± 61.9	255.0 ± 73.8	271.4 ± 80.2	235.0 ± 61.9	284.6 ± 105.6	373.4 ± 79.0	291.2 ± 60.3
P300	392.4 ± 60.5	415.0 ± 62.2	384.2 ± 70.3	398.2 ± 101.6	536.8 ± 68.1*	413.2 ± 70.1	405.0 ± 92.1	595.0 ± 84.9*	470.4 ± 64.5*

Tab 3. Latenze di N100, P200, N200, P300 in risposta ai paradigmi Sine Tones (ST), Subject's Own Name (SON) and Other First Name (OFN).

I dati sono indicati in termini di valori medi ± SD.

Abbreviazioni: SV, Stato Vegetativo, SMC, Stato di Minima Coscienza. * $P < .05$ vs ST.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno rivelato che il 54,5% dei pazienti in stato vegetativo può presentare una componente P300 in tutte le tre condizioni esaminate. La presenza di ERP riproducibili in pazienti presumibilmente non coscienti può indicare la capacità di cervelli gravemente danneggiati di eseguire parziali funzioni cognitive (Schiff e coll, 2002; Fischer e coll, 2008).

La percentuale di componenti ERP da noi riscontrata nei pazienti con gravi alterazioni della coscienza appare notevolmente superiore rispetto a quella riportata in letteratura. Ad esempio, Glass e coll. (1998) hanno dimostrato la presenza di un'onda P300 in risposta ai toni puri nel 38 per cento dei pazienti con gravi danni cerebrali. Kotchoubey e coll. (2001) trovarono la stessa percentuale: una chiara P300 poteva essere registrata in dieci dei loro 33 pazienti in SV.

Questa divergenza potrebbe essere spiegata da diversi fattori tra cui l'eterogeneità di eziologia, il livello di coscienza degli SV, i tempi e la tecnica di registrazione (Vanhaudenhuyse e coll., 2008). Tutti questi elementi potrebbero aver influenzato i nostri risultati. La maggiore possibilità di registrare ERPs a lunga latenza in pazienti in SV potrebbe essere condizionata anche dall'uso di stimoli salienti e l'uso di una condizione attiva in cui i partecipanti venivano istruiti a mantenere un conteggio mentale del numero di stimoli target (Schnakers e coll., 2008).

In secondo luogo, abbiamo suddiviso i pazienti in SV e in SMC sulla base di una osservazione clinica eseguita mediante il punteggio della scala DRS. Tuttavia, il recupero della coscienza è spesso pensato come un processo

graduale e la transizione da SV a più alti livelli di coscienza è spesso difficile da percepire. Così, alcuni dei nostri pazienti potrebbero essere stati diagnosticati come SV, ma manifestare in realtà alcuni fluttuanti segni di coscienza.

La presenza di un'ampiezza significativamente ridotta della N100 in risposta al paradigma ST nei pazienti in SV rispetto ai controlli può essere spiegato da un alterato meccanismo di *arousal* normalmente implicato nell'elaborazione automatica delle informazioni uditive. Picton e coll. (2000) hanno suggerito che l'attivazione della popolazione neuronale alla base della componente N100 provochi un transitorio diffuso *arousal* nei controlli sani. Questo meccanismo sembra essere invece alterato nei pazienti in stato vegetativo.

Tutti i partecipanti hanno mostrato una maggiore, seppur non significativa, ampiezza dell'onda P300 in risposta al paradigma SON rispetto al paradigma ST. Questi risultati sono in linea con recenti studi che dimostrano che il nome proprio del soggetto è in grado di generare più robusti ERPs in pazienti con gravi disturbi della coscienza (Perrin e coll, 2006; Fischer e coll, 2008). A differenza della P300 evocata da un tono, l'uso del nome del soggetto è stato riferito evocare una maggiore attività corticale (Ofek e coll., 2005) attraverso il coinvolgimento delle aree del giro frontale medio e superiore, delle aree di Broca e Wernicke, dell'ippocampo, della corteccia cingolata posteriore e della corteccia fronto-mediale (Fried e coll., 1997; Ofek e Pratt, 2005). Le differenze in ampiezza sono risultate statisticamente non significative.

La morfologia dell'onda P300, in particolare la sua latenza, è influenzata dalla rilevanza dello stimolo e aumenta sistematicamente con la complessità della categorizzazione semantica (Picton, 1992). Diversi studi hanno suggerito che la latenza della P300 rappresenta un indice del tempo di valutazione di uno

stimolo e la velocità di classificazione ed è sensibile alla complessità del compito. Di conseguenza, un più complesso stimolo può comportare un ritardo nell'orientamento verso nuovi stimoli (Polich, 1987; Maguire e coll., 2009). Nel presente studio la latenza della P300 tendeva ad aumentare con l'aumento della complessità di stimolo nei controlli sani e nei pazienti in SMC. Tuttavia, non vi fu alcuna evidente variazione dei parametri di latenza nei pazienti in stato vegetativo.

Diversi motivi potrebbero spiegare l'aumento della latenza dell'onda P300 in relazione al livello di complessità dello stimolo. In prima istanza, le proprietà fisiche delle condizioni ST, SON, e OFN differiscono in numerosi aspetti, quali la durata e la frequenza, probabilmente inducendo un aumento delle latenze di P300. Tuttavia, come precedentemente riportato, la discriminazione del nome proprio si svolge prima del suo completamento, e la latenza della P300 in risposta al paradigma SON potrebbe essere in qualche modo paragonabile alla latenza P300 dei toni puri acustici (Müller e Kutas, 1996; Perrin e coll., 1999). In secondo luogo, la modulazione della latenza dell'onda P300 nei pazienti in SMC potrebbe rappresentare l'integrità di alcuni processi cognitivi superiori, come la comprensione del linguaggio, e riflettere relativamente complesse elaborazioni dello stimolo target associate alla coscienza e consapevolezza di sé (Polich, 2007). Parallelamente, nei pazienti in SV una P300 evocabile in risposta a toni puri e parole dimostra la conservazione di meccanismi che richiedono che gli input sensoriali vengano confrontati con un modello di memoria rilevante (Kotchoubey e coll., 2005). Tuttavia, la mancanza in questi pazienti di una modulazione di latenza della P300 potrebbe riflettere una perdita dei processi di

elaborazione che richiedono una maggiore attenzione o dispendio cognitivo; processi, invece, in parte conservati nello SMC.

Il presente studio conferma che la componente P300 degli ERP può essere generata anche quando non viene espresso nessun comportamento cosciente da parte del paziente. Il processo endogeno, riflesso dalla presenza di una P300, è associato alla valutazione dello stimolo piuttosto che alla selezione della risposta. Pertanto, i pazienti nei quali era presente una P300 erano probabilmente in grado di rispondere coscientemente o non coscientemente a stimoli nuovi. L'uso del SON tendeva a evocare maggiori ampiezze P300 indicando una forte influenza di questo paradigma sull'onda cognitiva. Il risultato inatteso fu una mancanza di modulazione di latenza della P300 in pazienti in SV in relazione all'aumento di complessità stimolo. Questo potrebbe riflettere una maggior compromissione delle risorse cognitive che coinvolgono processi semantici e di comprensione linguistica che sono invece parzialmente o completamente conservati nello SMC.

In conclusione, la presenza di una modulazione di latenza dell'onda P300 potrebbe fornire informazioni preziose sulle capacità cognitive dei pazienti che non manifestano in maniera esplicita il loro comportamento cosciente ed aiutare quindi nella diagnosi differenziale tra diversi livelli di coscienza.

ESPERIMENTO 2

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, la neurochirurgia funzionale ha determinato notevole e crescente interesse nella comunità scientifica per il trattamento di numerosi disordini legati al movimento e alle funzioni cognitive quando la gravità della disabilità o le complicanze legate all'uso dei farmaci non sono più gestibili.

La Deep Brain Stimulation (DBS) è una tecnica utilizzata, per lo più, nella malattia di Parkinson, nel tremore essenziale, e nella depressione. Recentemente, il suo utilizzo si è esteso anche nell'ambito delle gravi cerebrolesioni acquisite. In un recente studio, Schiff e coll. (2007) impiantarono in un paziente in stato di minima coscienza alcuni elettrodi intracorticali sui nuclei talamici intralaminari anteriori e sulle adiacenti regioni paralaminari, fortemente marcate dalla calbindina. Questi neuroni positivi alla calbindina proiettano agli strati sopra granulari corticali, che sembrano avere un ruolo nell'attivazione cerebrale paragonabile a quello delle proiezioni del sistema di *arousal* del tronco encefalico. Gli autori si basarono su precedenti dimostrazioni della presenza di network cerebrali a lungo raggio nei pazienti in stato di minima coscienza. Il recupero di tali capacità funzionali residue sembrerebbe essere ostacolato dalla ipoattivazione cronica di network potenzialmente reclutabili che potrebbero essere rafforzati da interventi terapeutici mirati. La DBS del talamo centrale, in questo caso, fu in grado di modulare la responsività comportamentale del paziente dopo 6 anni dalla diagnosi di SMC a seguito di un trauma cranio-

encefalico. Nello specifico, il paziente manifestò più frequenti comportamenti cognitivamente mediati, maggior controllo funzionale degli arti e della nutrizione orale durante il periodo in cui la DBS veniva attivata. Gli autori conclusero che gli effetti della DBS sembrano compensare la mancata regolazione dell'*arousal*, normalmente controllata dal lobo frontale e promuovere il recupero funzionale dei pazienti con alterato stato di coscienza, anche tardivamente.

Le limitazioni della stimolazione profonda cerebrale sono tuttavia numerose. Essa rimane una procedura invasiva con rischi chirurgici e complicanze. Inoltre, una significativa barriera nel suo utilizzo consiste nell'eterogeneità sindromica e nella variabilità dei soggetti che potrebbero beneficiarne. La selezione di potenziali candidati alla DBS è limitata dall'attuale incapacità di valutare le funzioni cerebrali a letto del paziente (Glannon e coll., 2008).

I limiti riconosciuti nella DBS hanno permesso lo sviluppo parallelo di altri tipi di metodiche meno invasive, come la stimolazione magnetica transcranica (*transcranial magnetic stimulation*, TMS) e la stimolazione transcranica elettrica a correnti continue (*transcranial direct current stimulation*, tDCS).

Con la TMS è possibile indurre un flusso di corrente elettrica nel cervello attraverso un campo magnetico. La TMS tende a reclutare i neuroni piramidali in maniera indiretta, attraverso un'attivazione sinaptica da parte degli interneuroni orizzontali. Le onde evocate dalla stimolazione sono altamente sensibili al livello di eccitabilità corticale. Essa rappresenta quindi una metodica indolore non invasiva efficace nella valutazione dell'eccitabilità della corteccia motoria e dell'integrità della conduzione lungo le vie motorie periferiche e centrali.

La tecnica di stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS) consente di stimolare specifiche aree della corteccia cerebrale con treni di stimoli ad una determinata frequenza. Più elevate sono intensità e frequenza di stimolo, maggiore è il grado di disorganizzazione funzionale indotto nella corteccia. Tuttavia, dopo questo immediato effetto, la rTMS induce una successiva modulazione dell'eccitabilità corticale, attraverso la stimolazione diretta delle cellule piramidali ed indiretta degli interneuroni orizzontali.

Gli effetti indotti dalla stimolazione magnetica ripetitiva sull'eccitabilità corticale possono essere a breve termine, evidenziabili subito dopo la fine del treno di stimoli, e a lungo termine, presenti anche dopo diversi minuti dalla fine della stimolazione.

Un'evoluzione recente degli studi di rTMS nell'uomo è derivata dalla combinazione di questa metodica con tecniche di neuroimaging funzionale, che hanno permesso di documentare la riduzione o l'aumento del flusso ematico e del metabolismo nell'area stimolata a seguito di rTMS a bassa (1 Hz) e ad alta (10-20 Hz) frequenza della corteccia motoria (Pascual leone e coll., 1998; Fox e coll., 1997). I possibili meccanismi alla base degli effetti della rTMS possono essere spiegati attraverso il potenziamento e la depressione a lungo termine (*after effect*) della trasmissione sinaptica corticale o di meccanismi neuronali strettamente connessi ad essa. Studi su animali suggeriscono, inoltre, che la modulazione dei neurotrasmettitori e l'induzione genica possano contribuire a spiegare alcuni degli effetti modulatori a lungo termine (Keck e coll., 2000).

La possibilità fornita dalla rTMS di modificare, anche a lungo termine, l'eccitabilità di diverse aree della corteccia cerebrale ha dato una forte spinta innovativa nell'ambito delle neuroscienze per le possibili implicazioni terapeutiche

di questa metodica, potenzialmente utile per regolare livelli patologicamente aumentati o ridotti di attività corticale. Diversi studi sugli effetti terapeutici della rTMS in numerose patologie neurologiche psichiatriche stanno fornendo incoraggianti risultati (Berardelli e coll., 1998; Chen e coll., 1997; Fuggetta e coll., 2008; Ridding and Rothwell 2007) ed i recenti sviluppi nella coregistrazione EEG-rTMS hanno dato nuova luce allo studio della reattività EEG nell'uomo (Brignani e coll. 2008; Fuggetta e coll. 2008; Plewnia e coll., 2008; Manganotti e coll., 2012). Ciononostante, la letteratura è priva o carente di studi che si sono focalizzati sull'uso della rTMS in pazienti con alterazioni della coscienza (Lapitskaya e coll., 2009; Louise-Bender Pape e coll., 2009).

Generalmente, nei pazienti in SV, la rTMS è in grado di sincronizzare una semplice e locale risposta lenta, indicando una sorta di rottura dell'effettiva connettività, simile a quella osservata nel sonno inconscio o nei pazienti anestetizzati (Ferrarelli e coll., 2010; Massimini e coll., 2005, 2009). Al contrario, nei pazienti in SMC, che mostrano segni fluttuanti di comportamento non-riflesso, la rTMS sembra regolare attivazioni complesse che sequenzialmente coinvolgono aree corticali lontane ipsi- e controlaterali al sito di stimolazione.

Evidenze da studi elettrofisiologici sulla stimolazione transcranica della corteccia motoria primaria (M1) suggeriscono un progressivo aumento dell'eccitabilità dei circuiti locali durante rTMS, ma non solo. Variazioni remote dell'attività corticale e sotto-corticale, incluse le aree associative, il talamo, il nucleo caudato ed il putamen possono essere coinvolti nella stimolazione. La natura dell'effetto a lungo raggio della rTMS non è a tutt'oggi ben compreso. Il presunto effetto facilitatorio sull'attività neuronale in regioni remote può essere

prodotto attraverso connessioni trans-sinaptiche o attivazione diretta cortico-corticale o cortico-sottocorticale (Wu e coll., 2000).

Su queste basi, abbiamo ipotizzato che la rTMS potesse essere utile per studiare la responsività comportamentale nei pazienti in SMC, con possibili implicazioni terapeutiche. Infatti, la maggior parte dei pazienti in SMC mostra la costante presenza di network residui che sottendono l'espressione di pattern comportamentali frammentari (Laureys e coll., 2002; 2005).

Lo scopo del presente studio era di valutare la reattività elettroencefalografica e le risposte cliniche in un gruppo di pazienti con grave cerebro lesione e stato di alterata coscienza, prima e dopo un protocollo di stimolazione magnetica transcranica ad elevata frequenza.

METODI

Pazienti

In un gruppo di 19 pazienti in SV e SMC, ricoverati presso il centro di riabilitazione S.Camillo di Venezia, furono selezionati 6 pazienti (5 uomini, 1 donna; età media, 48 ± 19.4 anni) che incontravano i seguenti criteri di inclusione: assenza di controindicazioni alla TMS (Wassermann, 1998), condizioni stabili dei parametri vitali, arruolamento dopo oltre 12 mesi dall'evento lesivo. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei partecipanti sono mostrati in Tabella 4.

Tutti i pazienti furono valutati con la Disability Rating Scale (DRS) (Rappaport e coll., 1982) e con la JFK Coma Recovery Scale (JFK CRS-R) (Giacino e coll., 2004) (Allegato 2). La scala JFK CRS-R consiste in 23 *items*,

organizzati in maniera gerarchica, associati ai processi corticali, sottocorticali e del tronco encefalico e suddivisi in sei sotto-scale relative alle funzioni uditive, visive, motorie, oromotorie, di comunicazione e risvegliabilità. Gli *items* più bassi in ciascun sottogruppo rappresentano attività riflessa, mentre punteggi alti sono legati a comportamenti mediati cognitivamente.

In ogni paziente fu eseguita una valutazione neurofisiologica e clinica prima della sessione di rTMS ed immediatamente dopo.

N.	Età	Sesso	Diagnosi clinica	Etiologia	Correlate MRI	Mesi dalla lesione	DRS
1	70	M	SMC	Emorragico	Emorragia intraventricolare e talamica destra	48	27
2	37	F	SV	Traumatico	Lesioni corticali diffuse ed ematoma subdurale	34	26
3	67	M	SMC	Emorragico	Lesioni bifrontali multifocali	31	29
4	29	M	SMC	Traumatico	Lesioni bifrontali multifocali	94	24
5	38	M	SV	Traumatico	Lesione ponto-mesencefalica	36	23
6	27	M	SV	Emorragico	Ematoma centro-parietale	12	28

Tab. 4. Dati clinici e demografici dei sei pazienti in SMC/SV sottoposti a protocollo di rTMS

Procedura di stimolazione

La rTMS fu eseguita usando uno stimolatore Magstim-Rapid2 (Magstim Company Ltd, London, UK) che è in grado di generare un campo magnetico fino a 2.2 Tesla. La rTMS fu erogata tramite una bobina (coil) a forma di otto così da indurre un flusso di corrente elettrica con direzione antero-posteriore sulla

corteccia motoria primaria di destra o sinistra, in base alla presenza di potenziali evocati motori (PEM). I PEM furono registrati dal muscolo abduktore breve del pollice con elettrodi di superficie in Ag/AgCl fissati alla pelle con un montaggio ventre muscolare-tendine. Il segnale elettromiografico fu amplificato e filtrato (50 Hz to 20 kHz) tramite un'apparecchiatura EMG Medtronic ad una frequenza di campionamento di 5 KHz. Il coil fu posizionato tangenzialmente rispetto alla testa, con il manico puntato posteriormente e lateralmente con un angolo di 45° rispetto alla linea mediana. Il coil di stimolazione fu posto sopra il punto ottimale dello scalpo (hot-spot) ove si poteva ottenere il massimo potenziale evocato motorio, in corrispondenza del punto intermedio tra C3/C4 e P3/P4. L'intensità della soglia motoria (SM) fu determinata stimolando la corteccia motoria sovrasoglia e riducendo l'intensità a scalini di 1%. L'intensità di SM fu definita come l'intensità minore di output dello stimolatore in grado di indurre un PEM di ampiezza maggiore o uguale a 50 μ V nel muscolo bersaglio in almeno la metà di 10 treni di stimolo (Rossini e coll. 1994).

Generalmente, il rumore associato alla scarica del coil si propaga attraverso aria ed ossa e può evocare un complesso acustico N100-P200 a latenza di 100-200 ms (Nikouline e coll. 1999; Tiitinen e coll. 1999). In questo studio, abbiamo somministrato un rumore bianco a 90 dB attraverso cuffie acustiche per mascherare il click generato dal coil in tutti i pazienti per evitare qualsiasi effetto provocato dal suono nella modulazione delle attività oscillatorie corticali (Fuggetta e coll. 2005).

Ogni paziente fu sottoposto ad una sessione di 1000 stimoli erogati in 10 treni di rTMS a 20 Hz ad intensità liminale (Praagstra e coll., 1999). Ogni treno di stimoli durava 5 s con un intervallo interstimolo di 20 s. La stimolazione

magnetica venne somministrata seguendo le linee guida di sicurezza designate nel 1998 (Wassermann, 1998).

Disegno sperimentale

L'acquisizione dell'EEG a riposo e la stimolazione magnetica furono eseguite durante la stessa sessione sperimentale che consisteva in 5 condizioni:

1. Acquisizione EEG di base (3 min) al tempo T_0 , registrazione della soglia motoria a riposo (rSM) e dell'hot-spot sull'area M1 di destra/sinistra (sinistra per i pazienti n. 1, 2, 3, e 6; destra per i pazienti n. 4 e 5), registrazione del PEM al 20% sopra la rSM.
2. Stimolazione rTMS sull'area M1 di sinistra/destra: 5s di stimolazione seguiti da 20s di riposo, ripetuti 10 volte; registrazione della SM a riposo e del PEM al 20% sopra la SM.
3. Acquisizione EEG (3 min) al tempo T_1 ;
4. Fase di riposo psicosensoriale del paziente per 35 min;
5. Acquisizione EEG (3 min) al tempo T_2 .

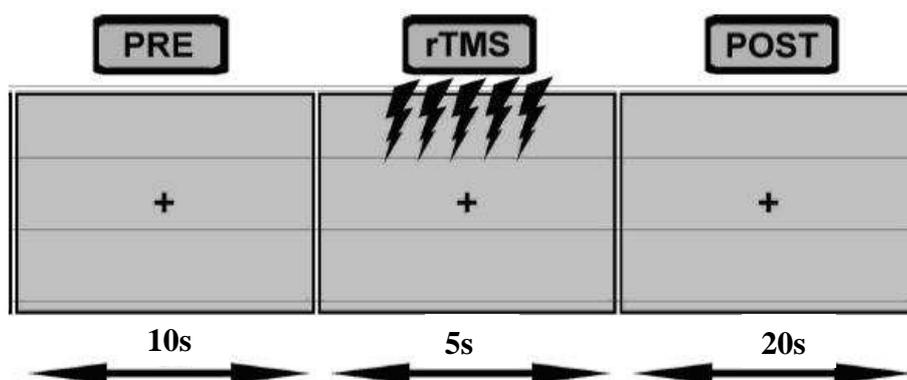


Fig. 4: Rappresentazione schematica del protocollo di stimolo rTMS.

L'EEG fu monitorato durante tutti le fasi dello studio; il computer sincronizzava l'impulso magnetico inserendo un marker nella traccia EEG. I dati acquisiti ai tempi T_0 , T_1 e T_2 vennero usati per l'analisi di potenza.

Registrazione dei dati EEG

L'elettroencefalogramma fu acquisito utilizzando un amplificatore EEG compatibile con MRI (SD MRI 21, Micromed, Treviso, Italy) ed una cuffia costituita di 21 elettrodi posizionati in accordo con il sistema internazionale 10/20. Il surriscaldamento degli elettrodi nelle dirette vicinanze del coil magnetico fu minimizzato dall'uso di elettrodi Ag/AgCl TMS-compatibili (8mm di diametro, 0.5mm di spessore) dotati di un rinforzo di 2mm per limitare la diffusione del flusso di corrente indotta. Il riferimento fu posizionato su FPz e la terra posteriormente ad Fz, come riportato da precedenti studi (Formaggio e coll., 2008; Storti e coll. 2012). Oltre ai canali EEG, due canali furono dedicati alla registrazione del segnale elettrocardiografico (ECG) ed elettromiografico (EMG). L'elettrodo EMG fu posizionato sul muscolo abduktore breve del pollice (APB).

I dati EEG vennero campionati alla frequenza di 2048Hz usando il software SystemPlus (Micromed, Treviso, Italy). L'amplificatore EEG era dotato di una risoluzione di 22 bits con un range di ± 25.6 mV per evitare la saturazione del segnale. Per quanto riguarda il filtraggio, è stato utilizzato un filtro hardware passa-banda anti-aliasing compreso tra 0.15 e 269.5Hz.

Analisi dei dati EEG

Le registrazioni EEG sono state ottenute tramite il calcolo della referenza media locale usando il software EEGLAB, strumento di Matlab (Delorme and Makeig, 2004). Sono stati applicati un filtro notch (50 Hz) ed una correzione della linea di base a tutti i canali, nonché un filtro passa-banda a 1-30 Hz mediante un filtro FIR (*Finite Impulse Response*). Le epoche EEG contenenti artefatti oculari, muscolari o di altra natura sono state identificate e successivamente eliminate. Furono selezionate tre condizioni per l'analisi offline: i dati EEG a riposo acquisiti prima (T_0) e dopo la rTMS (T_1) e 40 minuti dopo il termine (T_2). Ogni canale è stato segmentato in epoche non sovrapposte della durata di 2 secondi ciascuna. Successivamente, è stata applicata una trasformata fast Fourier (FFT) ad ogni epoca, ciascuna contenente 2048 punti, con una risoluzione massima di 0.50 Hz e poi mediata alle altre epoche appartenenti alla stessa condizione (T_0 , T_1 e T_2). La densità dello spettro di potenza $P_x(f)$ ($\mu V^2/Hz$) fu stimata per tutte le frequenze comprese tra 0 e 50 Hz, e la potenza relativa (%) per le bande di frequenza delta (1-4 Hz), teta (5-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (13-30Hz), secondo l'equazione (1):

$$(1) \quad \frac{\int_1^4 P_x(f) df}{\int_1^{30} P_x(f) df} \quad (\text{delta}) \quad \frac{\int_1^8 P_x(f) df}{\int_1^{30} P_x(f) df} \quad (\text{teta}) \quad \frac{\int_1^{12} P_x(f) df}{\int_1^{30} P_x(f) df} \quad (\text{alfa}) \quad \frac{\int_1^{30} P_x(f) df}{\int_1^{30} P_x(f) df} \quad (\text{beta})$$

È stata applicata un'analisi della varianza (ANOVA) a misure ripetute per le potenze relative, le soglie motorie ed i potenziali motori, con "tempo" (T_0 , T_1 , T_2) come fattore "between subjects". L'assunzione di sfericità fu valutata tramite il Mauchly's test. La correzione epsilon di Greenhouse-Geisser per la non-sfericità fu adottata dove appropriato. Il t-test fu utilizzato come test post-hoc con correzione di Bonferroni. Per tutti i test statistici, un valore di <0.05 fu considerato significativo.

RISULTATI

Effetti clinici e sulla reattività EEG

Sui sei pazienti esaminati e sottoposti al protocollo di stimolazione solo un paziente in SMC ebbe una buona risposta clinica. Il caso verrà preso in esame separatamente nel successivo capitolo. Dopo la stimolazione magnetica, il paziente ebbe un notevole miglioramento della sua reattività: mostrò attivi meccanismi di risvegli abilità, con occhi focalizzati sull'esaminatore ed in grado di eseguire piccoli movimenti funzionali della mano e del braccio a comando. Gli effetti clinici durarono per 6 ore (Piccione e coll., 2011). Gli altri pazienti non riportarono alcuna risposta clinica significativa.

Effetti neurofisiologici: reattività EEG

In cinque pazienti fu riscontrabile una diminuzione di potenza, anche non significativa, per tutte le bande, immediatamente dopo la stimolazione e dopo 40

minuti, eccetto in C4 ed F3 dove la potenza della banda delta aumentò in T₂, e per F3 dove la potenza beta aumentò al tempo T₁ (Fig. 5 e 7).

Viceversa, nel paziente con miglioramento clinico (paziente 1) fu osservata una buona reattività EEG: immediatamente dopo la rTMS vi fu un aumento di ampiezza del segnale mantenuto anche dopo 40 minuti (Fig. 6 e 8). Inoltre, si osservò un aumento persistente della potenza di tutti i ritmi, in particolare del ritmo delta, al tempo T₁ e T₂ (Fig. 8).

Effetti neurofisiologici: soglia motoria e ampiezza dei PEM

In tutti i sei partecipanti la soglia motoria, misurata prima della rTMS per determinare l'intensità di stimolazione, si ridusse in modo significativo dopo la stimolazione cerebrale ($F_{(1.007,4.028)} = 34,801$, $p < 0,05$), parallelamente ad un incremento significativo dell'ampiezza dei PEM ($F_{(2,10)} = 7,964$, $p < 0,05$). La diminuzione della soglia motoria fu statisticamente significativa tra T₀ e T₁ ($p < 0,05$) e tra T₀ e T₂ ($p < 0,05$), mentre l'aumento dei PEM risultò significativo solo tra T₀ e T₂ ($p < 0,05$).

In sintesi, la diminuzione della SM e l'aumento di ampiezza dei PEM furono osservabili a T₁, dopo la rTMS, e T₂, dopo 40 minuti. L'aumento di eccitabilità motoria si notò anche nei cinque pazienti che non presentarono alcuna reazione clinica ed elettroencefalografica alla stimolazione cerebrale.

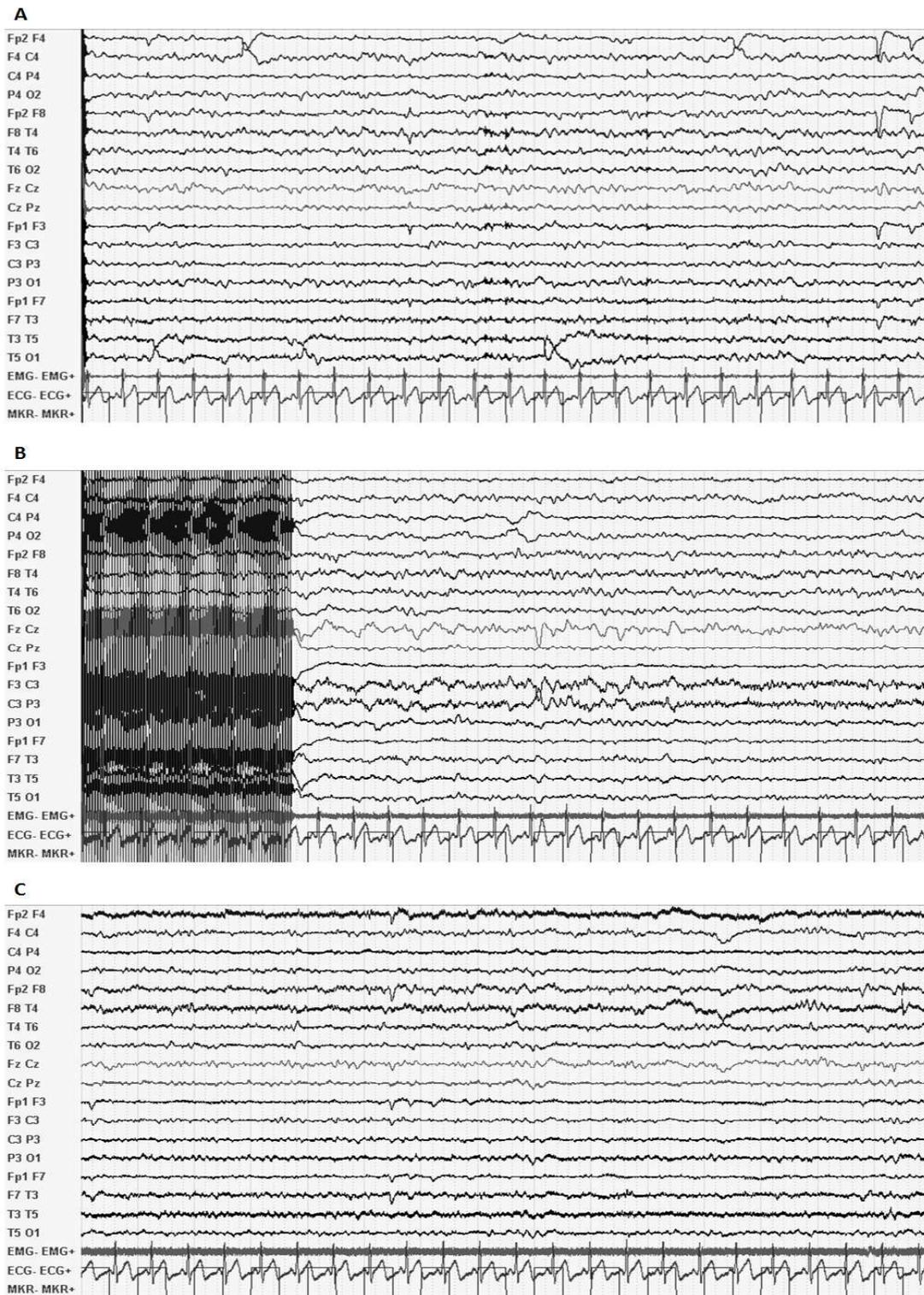


Fig. 5. Tracciati EEG del paziente n.6 che non mostrò una variazione del quadro clinico dopo rTMS: (A) EEG durante condizione di riposo T_0 ; (B) immediatamente dopo rTMS, T_1 e (C) 40 minuti dopo, T_2 . (Ampiezza EEG: 70 $\mu\text{V}/\text{cm}$; Ampiezza EMG: 100 $\mu\text{V}/\text{cm}$; Ampiezza ECG: 300 $\mu\text{V}/\text{cm}$).



Fig. 6. Tracciati EEG del paziente n.1 che mostrò una variazione del quadro clinico dopo rTMS: (A) EEG durante condizione di riposo T_0 ; (B) immediatamente dopo rTMS, T_1 e (C) 40 minuti dopo, T_2 . (Ampiezza EEG: $70 \mu\text{V}/\text{cm}$; Ampiezza EMG: $100\mu\text{V}/\text{cm}$; Ampiezza ECG: $300 \mu\text{V}/\text{cm}$).

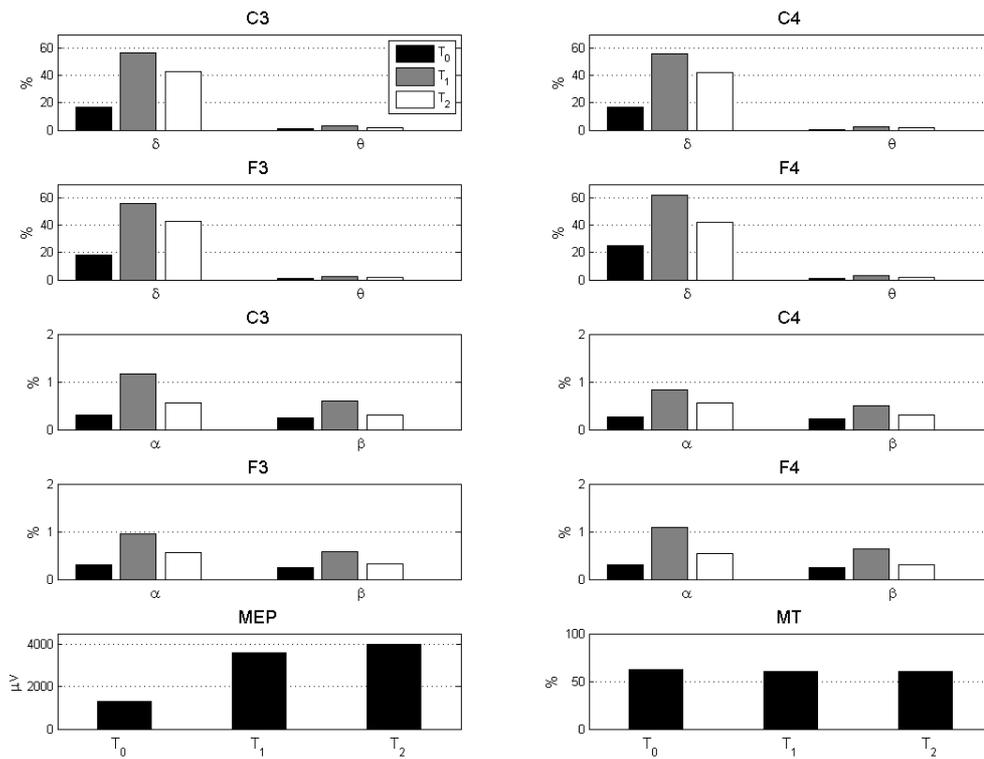


Fig 7. Paziente n.1. potenze relative delle bande di frequenza delta, teta, alfa e beta (%) agli intervalli T₀, T₁, T₂. Sotto, valori dei PEM (μV) e della soglia motoria (%) a T₀, T₁, T₂.

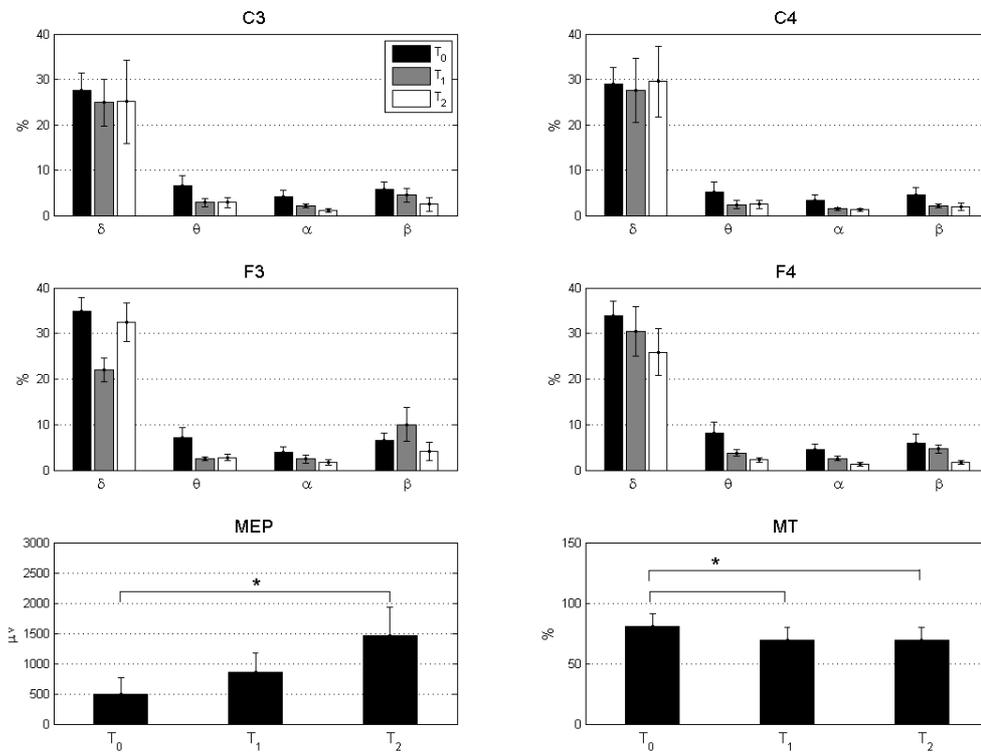


Fig. 8. Sopra, grand average (5 pazienti non reattivi) delle potenze relative (%) di delta, teta, alfa e beta al tempo T₀, T₁, T₂ per gli elettrodi posti sopra M1. Sotto, valori medi dei PEM (μV) e della soglia motoria (%) agli intervalli T₀, T₁, T₂.

CASE REPORT

Tenendo conto della mancanza di cambiamenti clinici per un lungo periodo di tempo in un paziente diagnosticato essere in SMC, abbiamo deciso di studiare gli effetti della stimolazione magnetica transcranica ripetitiva sul suo comportamento e sull'attività elettroencefalografica.

Babiloni e coll. hanno dimostrato che esiste una relazione tra attività alfa elettroencefalografica e consapevolezza cosciente (Babiloni e coll., 2009). La banda di frequenza alfa è predominante sulle regioni posteriori (ritmo alfa) e rolandiche (ritmo mu). È modulata da input sensoriali ed efferenze motorie e quindi è pensata riflettere il ritmo spontaneo delle aree sensoriali e sensori-motorie (Manshanden e coll., 2002). Entrambi i ritmi alfa e mu indicano un sistema inibitorio integro, necessario per bloccare le informazioni irrilevanti durante meccanismi di attenzione focalizzata e di memoria (Pfurtscheller e Lopes da Silva, 1999; Klimesch, 1999)

L'EEG è un metodo ampiamente accettato per ottenere informazioni specifiche sul livello di elaborazione corticale delle informazioni e le modificazioni che si verificano durante la perdita di coscienza ed i diversi stati di consapevolezza (Leon-Carrion e coll., 2008). In generale, più appare grave il danno cerebrale, maggiore sarà la presenza di bande lente all'EEG. Gli spettri di potenza e l'analisi di coerenza, generalmente, mostrano una riduzione della potenza EEG regionale per quasi tutte le frequenze, in relazione alla lesione cerebrale sottostante (Kobylarz e Schiff, 2005). Perciò esiste un ampio spettro di caratteristiche EEG patologiche che coinvolge numerosi network cerebrali. Tenendo in considerazione i dati di cui sopra, si può dedurre che un aumento

della banda di frequenza alfa sia correlato con un miglioramento della funzione del paziente.

Nel presente studio, abbiamo utilizzato la rTMS sulla corteccia motoria primaria. Questo sito di stimolazione è stato scelto sulla base di precedenti studi che hanno applicato la TMS ripetitiva alla corteccia motoria ed osservato un aumento transitorio di oscillazioni neuronali nelle bande di frequenza alfa e beta (Tamura e coll., 2005; Fuggetta e coll., 2005; Brignani e coll., 2008). Gli studi di coregistrazione TMS-EEG finora presenti in letteratura hanno riscontrato che la sincronizzazione dell'attività neuronale mostra specificità topografica (Van Der Werf e Paus, 2006). Così, la reattività alfa e beta è più evidente dopo la stimolazione magnetica della corteccia sensoriale o motoria che dopo stimolazione della corteccia dorsale premotoria. La stimolazione con rTMS della corteccia dorsale premotoria è più spesso associata a variazioni della potenza delle bande di frequenza più basse, teta e delta (Okamura e coll., 2001; Griskova e coll., 2007). Infine, M1 è l'unico sito che garantisce uno strumento di sicurezza per controllare l'eccitabilità della corteccia "in tempo reale" al fine di evitare possibili effetti epilettogeni (Wassermann, 1998).

Come controllo per la stimolazione magnetica corticale, più diretta, abbiamo utilizzato una stimolazione del nervo periferico poiché la maggior parte dei suoi parametri di stimolo e la condizione sperimentale sono paragonabili a quelle utilizzate nella rTMS. Inoltre, la stimolazione periferica è in grado di attivare il sistema motorio centrale e può favorire il recupero negli stati di compromissione della coscienza (Cooper e coll., 1999).

Nel presente studio è stato descritto un paziente maschio di 70 anni che nel 2008 soffrì di un'improvvisa perdita di coscienza ed emiplegia sinistra causata da

una vasta emorragia talamica ed un ictus ischemico a livello dei gangli della base a sinistra. Un mese dopo l'insulto, il paziente presentava un livello minimo di coscienza: apriva gli occhi spontaneamente od in risposta alla stimolazione dolorosa, volgeva gli occhi verso la sorgente dei suoni e seguiva con lo sguardo un oggetto in movimento. La comunicazione verbale e scritta erano assenti.

Una registrazione prolungata EEG mostrava un ritmo di veglia alternato ad attività lenta intermittente generalizzata. L'alternanza di questi due stati indicava un preservato ciclo sonno/veglia. La Glasgow Outcome Scale (GOS) indicava un punteggio di 2, con una diagnosi di SMC. Nei quattro anni successivi, il punteggio della GOS del paziente, valutata ad intervalli di sei mesi, rimase invariata.

A distanza di quattro anni dall'evento lesivo, il paziente è stato ricoverato presso il nostro istituto, per la sperimentazione sul recupero di coscienza associato all'utilizzo di stimolazione magnetica transcranica, precedentemente descritta.

Dal punto di vista clinico, le funzioni residue del paziente sono state valutate tramite la scala JFK CRS-R. Il paziente presentò un punteggio di 14. Apriva gli occhi spontaneamente, localizzava gli stimoli sonori e nocicettivi ritirando l'arto vicino alla fonte del dolore, seguiva visivamente oggetti in movimento e vocalizzava senza utilizzare parole comprensibili.

Per tale progetto sperimentale è stato utilizzato un protocollo di stimolazione A-B-A. Il paziente partecipò a tre diverse sessioni intervallate l'una dall'altra di tre giorni. Nella prima sessione (condizione A), il paziente è stato sottoposto a 10 treni di stimolazione magnetica transcranica a 20 Hz erogati attraverso un coil a forma di otto collegato ad uno stimolatore magnetico Rapid2

® (massima potenza 2,2 Tesla) per 10 minuti. L'intensità dello stimolo è stata fissata al 10% al di sotto della soglia motoria a riposo del partecipante con il coil posto sopra la corteccia motoria primaria sinistra (M1). Nella seconda sessione (condizione B), è stata eseguita una stimolazione elettrica periferica come condizione di controllo. Il paziente è stato sottoposto a stimolazione del nervo mediano al polso per un periodo di 10 minuti. L'intensità dello stimolo era valutata essere quella necessaria per evocare un movimento periodico del pollice con una frequenza di 3 Hz. La stimolazione del nervo mediano è stata utilizzata come condizione di controllo, poiché è noto favorire il risveglio di alcuni pazienti in stato di coma, in particolare da stato vegetativo e SMC. Inoltre, la stimolazione del nervo mediano può evocare sensazioni somatosensoriali e risposte ripetitive muscolari periferiche paragonabili a quelle avvertite durante rTMS e, quindi creare una condizione di controllo sovrapponibile. Infine, il terzo blocco di stimolazione (condizione A) consisteva in una seconda sessione di rTMS per replicare la stabilità degli effetti ottenuti precedentemente.

Ogni sessione di stimolo veniva preceduta e seguita da 30 minuti di registrazione elettroencefalografica. Successivamente, sono stati eseguiti venti minuti di EEG a riposo ogni ora per otto ore al fine di poter osservare la durata di eventuali variazioni cliniche del paziente dopo la stimolazione. A sei mesi dalla sperimentazione, è stato eseguito un follow-up.

La metodica di acquisizione ed analisi EEG è ampiamente descritta nel precedente capitolo.

La valutazione clinica dello stato di coscienza è stata eseguita utilizzando la scala JFK CRS-R. Due valutatori in cieco esaminarono il paziente immediatamente prima e dopo ogni seduta di stimolazione e ad intervalli regolari

di un'ora (fino a otto) per evidenziare eventuali modificazioni del quadro clinico. Il monitoraggio EEG è stato eseguito dopo ogni valutazione clinica del paziente.

I dati elettrofisiologici furono analizzati nelle varie condizioni (A, B, A) con un'analisi delle varianze (ANOVA) a misure ripetute (fattore principale 'stimolazione' $p < 0,05$). L'analisi post-hoc fu testata mediante il t-test corretto secondo Bonferroni.

La registrazione EEG a riposo eseguita prima della stimolazione con rTMS metteva in evidenza un diffuso rallentamento dei tracciati (nel range di frequenze teta e delta) e l'assenza di reattività del ritmo posteriore dominante. L'analisi spettrale della potenza EEG evidenziava una riduzione in potenza di tutte le frequenze, più marcata nell'emisfero destro.

Dopo stimolazione del nervo mediano (condizione B), il paziente non mostrò nessun cambiamento clinico-comportamentale e l'EEG non variò significativamente (Fig. 9D).

Immediatamente dopo la prima sessione di rTMS (condizione A), tuttavia, il punteggio della scala JFK CRS-R passò da 13 a 19 (funzione uditiva: 4; funzione visiva: 5; funzione motoria: 5; funzione oro motoria/verbale: 2; risvegliabilità: 3). Il paziente si mostrò in grado di mantenere gli occhi aperti e di eseguire compiti complessi su comando verbali, come ad esempio afferrare un bicchiere e portarlo alla bocca per bere. Dopo sei ore dalla stimolazione, il paziente continuava a presentare segni di un'aumentata risvegliabilità e coscienza, studiava il campo intorno a sé e manteneva abilità di manipolazione degli oggetti. Questi cambiamenti comportamentali dopo una sessione di rTMS suggeriscono che il paziente aveva riacquisito, in qualche modo, la capacità di comprendere comandi semplici e di riconoscere, raggiungere ed usare oggetti. Il

miglioramento comportamentale, confermato dalla valutazione clinica, ripetuta ogni ora, durò sino a sei ore dopo la sessione di rTMS. Successivamente, a sette ore dalla valutazione iniziale, il paziente appariva meno reattivo, non più in grado di eseguire comandi vocali. La scala JFK CRS-R mostrava uno score di 14.

La seconda sessione di rTMS (seconda condizione A) fu somministrata due giorni dopo e portò a simili risultati. Il paziente manifestava alcuni cambiamenti comportamentali come stringere la mano a comando e seguire l'esaminatore con lo sguardo. La scala JFK CRS-R mostrò, ancora una volta, un miglioramento da 14 a 19 punti.

Il miglioramento clinico del paziente nelle prime sei ore fu accompagnato da significativi cambiamenti degli spettri di potenza EEG. Le Figure 9A, 9B e 9C illustrano le mappe topografiche dell'attivazione corticale legata alla rTMS, distinte in quattro range di frequenza (0.5-4 Hz, 4-8 Hz, 8-13 Hz, 13–20 Hz).

Le differenze tra prima e immediatamente dopo la stimolazione magnetica apparivano significative nella banda alfa (8-13 Hz), nella banda beta bassa ed alta (13-20 Hz) e nelle frequenze delta (0.5-4 Hz) ($p < 0.01$). In banda alfa, il risultato principale fu un significativo aumento dell'attività, che si estendeva dalla regione centrale alle aree posteriori e frontali. In banda delta, si potevano osservare risultati più variabili ed un globale aumento dell'attivazione corticale sulle regioni centrali, frontali e pre-frontali. La frequenza beta mostrava un'attivazione diffusa, più marcata sulle regioni centrali. A 4-8 Hz (banda teta) non furono trovate differenze statisticamente significative.

Simili caratteristiche spettrali all'EEG furono osservate fino a sei ore dalla stimolazione. Dalla settima ora, non fu più presente alcuna significativa

attivazione corticale. Le modificazioni EEG osservate nella prima sessione di rTMS furono sostanzialmente replicate nella seconda.

Clinicamente, alla settima ora, il paziente appariva esausto: a tratti apriva gli occhi, difficilmente a comando, e non poteva svolgere alcun ordine semplice. La valutazione clinica alla JFK CRS-R registrò un punteggio di 11.

Ad un follow-up a sei mesi, le condizioni cliniche e neurofisiologiche apparivano le stesse che il paziente aveva presentato prima dell'esperimento.

La rTMS, caratterizzata da correnti transcraniche indotte da stimolazione ripetitiva superiore a 5 Hz, depolarizza i neuroni al di sotto della sonda di stimolazione ed influisce indirettamente sulle aree deputate alle funzioni cognitive e comportamentali (Guse e coll., 2009).

Una singola sessione di rTMS erogata sull'area motoria primaria fu in grado di indurre un temporaneo miglioramento comportamentale ed un aumento dei pattern corticali oscillatori (ritmi alfa e beta) e probabilmente sotto-corticali (attività delta) in un paziente in stato di minima coscienza. Sebbene la stimolazione con rTMS fosse focale su M1, gli effetti osservati furono diffusi e coinvolsero molti siti di registrazione. Questo potrebbe essere spiegato grazie alla conduzione di volume dovuta alla bassa risoluzione spaziale dell'EEG o di un *arousal* generalizzato da parte del paziente. La vicinanza e l'interconnessione tra le aree di stimolazione M1 e dorso laterale prefrontale (DLPF) potrebbe spiegare l'aumento della banda delta. Infatti, Okamura e Griskova trovarono un aumento in potenza delle bande di frequenza più lente dopo stimolazione con rTMS dell'area dorsolaterale prefrontale (Okamura e coll., 2001; Griskova e coll., 2007).

L'aumento dell'attività oscillatoria in banda alfa può essere dovuta alle maggiori interazioni cortico-talamiche (Laureys, 2005). I cambiamenti diffusi nella potenza delta accompagnati dall'aumento delle altre bande di frequenza potrebbero rappresentare una modificazione dell'attività metabolica cerebrale. Come riportato in altri studi, l'applicazione della rTMS ad alta frequenza sembra favorire un aumento del rilascio di dopamina che modula l'attività delta. Mentre solitamente la dominanza di attività delta indica una compromissione della coscienza e consapevolezza, il correlato miglioramento delle bande di frequenza più rapide potrebbe indicare una relativa normalizzazione della condizione metabolica (Guse e coll., 2009).

Variazioni dell'attività cerebrale nei pazienti in SMC o stato vegetativo potrebbero indicare la presenza di funzioni cognitive parzialmente conservate. Le regioni implicate in queste funzioni, tuttavia, non sono integrate in un network completo di elaborazione delle informazioni a causa della presunta interruzione tra queste aree ed il talamo (Schiff e coll., 2002). Dai dati descritti finora, non possiamo concludere inequivocabilmente che la rTMS induca un miglioramento della coscienza nei pazienti in SMC. Tuttavia, il caso da noi esaminato getta le prime basi verso un primo approccio terapeutico non invasivo dei pazienti con alterazioni della coscienza, anche a distanza di anni dalla lesione. I miglioramenti clinici osservati nel presente studio sono simili a quelli riportati in un paziente in SMC che fu trattato con stimolazione elettrica cerebrale profonda bilaterale nel talamo centrale usando frequenza di 50-100 Hz (Schiff e coll., 2007). La DBS, tuttavia, è un intervento invasivo e non appropriato per essere un trattamento di routine poiché non è ancora chiaro quali pazienti possano beneficiarne. Rischi e costi possono scoraggiare dall'uso di questa metodica. Inoltre, il caregivers o il

rappresentante legale spesso non danno il loro consenso per l'impianto degli elettrodi per DBS, come accaduto nel nostro caso. La moglie del paziente, infatti, rifiutò ulteriori stimolazioni rTMS a causa della marcata non responsività del paziente dopo sette ore dalla stimolazione.

I risultati ottenuti nel presente studio suggeriscono che l'effetto terapeutico della rTMS su cervelli parzialmente disconnessi o lesi potrebbe essere associato allo ristabilimento dell'attività ritmica dei neuroni nel pacemaker talamico e di conseguenza migliorare le connettività funzionali (Kotchoubey e coll., 2005; Sharova e coll., 2007). La rTMS sembra essere utile nell'identificare un sottogruppo di pazienti in SMC che potrebbero beneficiare di tecniche di stimolazione più invasive come la DBS. I pazienti che rispondono alla rTMS eccitatoria potrebbero essere i candidati ideali per l'impianto permanente di DBS. Non escludiamo la possibilità che la stimolazione transcranica possa anche avere un ruolo terapeutico nei pazienti con disordini di coscienza, promuovendone un recupero cognitivo.

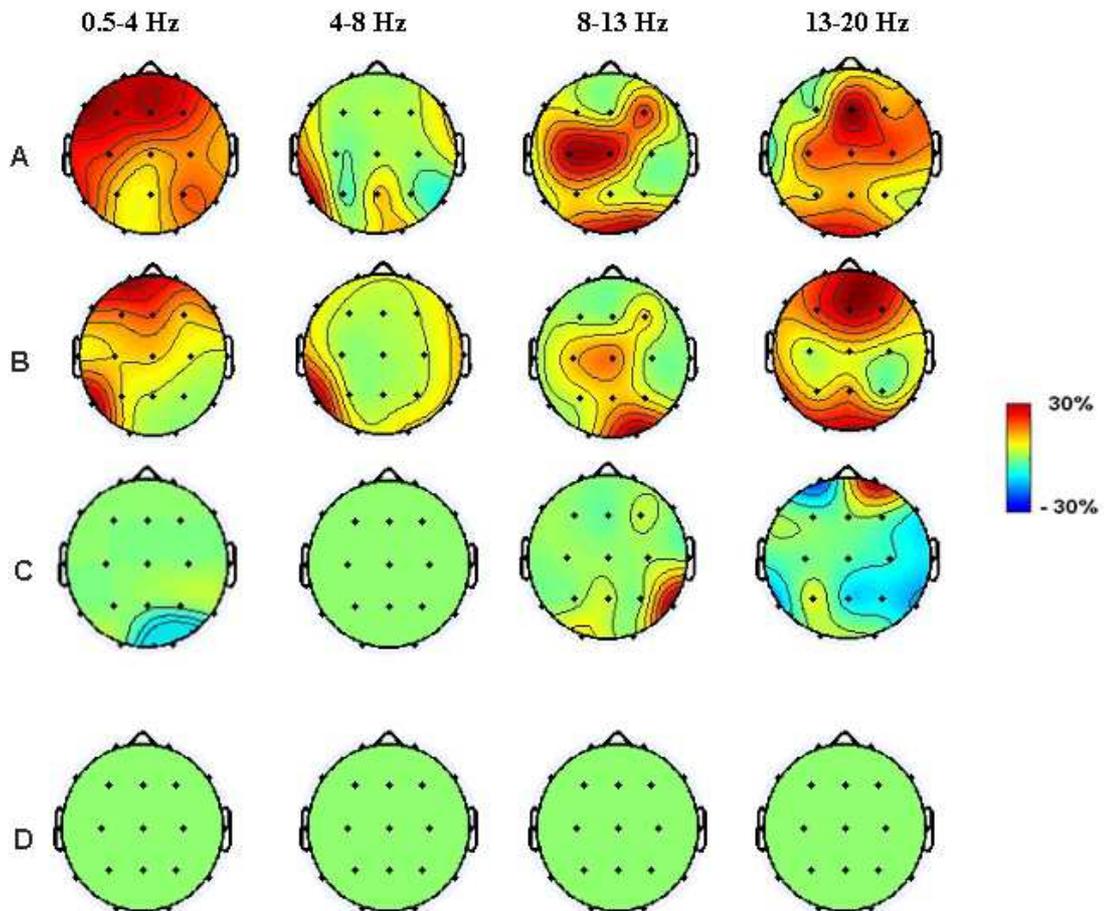


Fig. 9. Spettri di potenza EEG. L'attivazione corticale, intesa come variazione indotta dalla rTMS, rispetto all'attività a riposo (in percentuale con segno positivo), è indicata con il colore rosso. Il risultato principale fu un significativo aumento dell'attività in banda alfa che si estendeva dalle regioni centrali alle posteriori ed alla corteccia frontale e prefrontale. La frequenza beta mostrò una attivazione diffusa, più evidente sulle regioni centrali. A 4-8 Hz, non furono osservate significative variazioni. Questi correlati furono osservati immediatamente dopo la rTMS (A) e fino a sei ore più tardi (B). Dopo sette ore dalla stimolazione, non furono osservate significative variazioni dell'attivazione corticale (C). La (D) non mostra differenze significative tra prima e dopo stimolazione elettrica periferica.

Il lato destro di ogni mappa corrisponde al lato destro del cervello.

ESPERIMENTO 3

PRIMA FASE: Localizzazione dell'area di stimolazione

INTRODUZIONE

Numerosi trattamenti sono stati sperimentati per cercare di promuovere il recupero di coscienza dal coma o dallo stato vegetativo. Riuscire a riconoscere i cambiamenti che precedono e caratterizzano il recupero della coscienza è fondamentale per instaurare un giusto programma di riabilitazione e cura del paziente.

I primi studi di stimolazione elettrica del sistema nervoso risalgono alla fine degli anni '60. Nello stato vegetativo si è tentato il recupero della coscienza mediante la stimolazione encefalica profonda e del midollo spinale previo intervento chirurgico. La maggior probabilità di avere un quadro di recupero funzionale è prevista nei primi 3-4 mesi di stimolazione. Tuttavia le condizioni cliniche dei pazienti esaminati non sono sempre state descritte in dettaglio e le casistiche appaiono molto limitate. Generalmente, i pazienti inclusi nel programma di stimolazione elettrica profonda sono accuratamente selezionati e mostrano alcuni segni di comportamenti coscienti, come l'inseguimento visivo sostenuto, che pongono dubbi sulla reale efficacia della metodica rispetto alla naturale evoluzione della patologia (Verlicchi e Zanotti, 2000)

Dall'esperienza osservata e precedentemente descritta, dopo una singola applicazione di rTMS ad elevate frequenze, il passo successivo fu di costruire un

protocollo più complesso di stimolazioni che comprendesse stimolazioni somatosensoriali aspecifiche, stimolazioni magnetiche transcraniche e elettriche a correnti continue (tDCS).

L'introduzione della tDCS fu fatta, in primo luogo, per permettere l'arruolamento di un numero più consistente di soggetti. Infatti, per quanto la rTMS possa risultare efficace nel modulare l'eccitabilità corticale, a causa dei campi magnetici prodotti, non può essere utilizzata su pazienti portatori di impianti metallici, pacemaker e pompe di perfusione di Baclofen. Ancora, la metodica è controindicata in presenza di pazienti con pregresse crisi epilettiche poiché favorisce l'insorgenza di ulteriori episodi convulsivi. In secondo luogo, la tDCS ha un semplice utilizzo ed il costo è molto ridotto rispetto alla stessa TMS.

La stimolazione elettrica a correnti continue, diversamente dalla magnetica, non induce potenziali d'azione. I meccanismi di azione della tDCS non sono ancora completamente chiari, ma sembra coinvolgano una combinazione di modificazioni della funzione sinaptica e di iper/depolarizzazione assonale. Gli effetti prodotti hanno molte caratteristiche dell'induzione di processi di neuroplasticità sinaptica, tra cui la durata degli effetti, che dipende dall'intensità di stimolazione, l'origine intracorticale e la sua dipendenza dall'attività dei recettori-NMDA (Paulus, 2004). Da alcune indagini sui molluschi *Helix pomatia* and *Helix lucorum* sembra che l'effetto della stimolazione elettrica sia associato al ristabilimento dell'attività ritmica dei neuroni dovuta ad un generatore endogeno. Anche se i modelli esaminati non sono del tutto sovrapponibili all'uomo, questi risultati potrebbero comunque rappresentare una risposta al modo di agire della stimolazione (Sharova e coll., 2007).

Per quanto riguarda l'efficacia terapeutica della tDCS si trovano, in letteratura, alcuni incoraggianti studi. Molti ricercatori hanno evidenziato come la tDCS possa migliorare la memoria di lavoro, modificare la percezione del dolore ed influire sull'umore in base alle specifiche aree stimulate. Nel 2007 Sharova e coll. pubblicarono uno studio sulle modificazioni dell'attività elettrica cerebrale spontanea durante stimolazione elettrica transcranica ritmica (Sharova e coll., 2007). Lo studio fu eseguito su 6 pazienti in stato vegetativo post-traumatico e prevedeva la stimolazione del lobo frontale, adottata in base alla correlazione in precedenza osservata tra il livello dell'attività funzionale dello stesso ed il buon outcome cognitivo dei pazienti. Il trattamento diede esiti positivi in cinque dei sei pazienti, con la comparsa di reazioni emozionali e del riflesso di fissazione. Alle modificazioni cliniche si accompagnò un riarrangiamento fasico dell'EEG e della sua coerenza (Sharova e coll., 2007).

Solo recentemente, grazie al lavoro di Polania e coll. (2012), si è potuto dimostrare che la tDCS applicata su M1 induce modificazioni sulla sincronizzazione del tracciato EEG e sulla organizzazione topologico-funzionale dei soggetti sani, modificando in maniera significativa le coerenze in tutte le bande di frequenza studiate (teta, alfa, beta, gamma).

L'efficacia della tDCS è stata testata anche sulla corteccia parietale. In condizioni fisiologiche, l'elaborazione sensoriale rappresenta un interscambio dinamico tra diverse aree della corteccia parietale – il network ventrale facilita l'orientamento verso il cambiamento o la salienza dell'ambiente circostante, e il sistema parietale dorsale dirige, nel contempo, le altre risorse verso specifici obiettivi pre-selezionati (Corbetta e Shulman, 2002).

Alcuni ricercatori si sono concentrati sull'applicazione della tDCS nel sonno. In particolare, Roizenblatt e coll. (2007) condussero uno studio sul sonno e sul dolore nei pazienti affetti da fibromialgia stimolando le cortecce DLPF e M1. I risultati dimostrano che la stimolazione delle due aree comporta effetti opposti sulla struttura del sonno. Il trattamento su M1 sembrerebbe aumentare l'efficienza del sonno e diminuire il numero di *arousal* mentre la stimolazione di della corteccia DLPF si associa a un calo di efficienza del sonno, ad un aumento di movimenti rapidi oculari (REM) e della latenza del sonno.

La letteratura sembra concordare sul fatto che la stimolazione elettrica a correnti dirette aumenti la coerenza dei ritmi cerebrali, e che ci sia una relazione tra gli effetti funzionali della tDCS e l'aumento di interazioni inter- ed intra-emisferiche.

Lo scopo primario del presente studio fu valutare se l'applicazione di stimolazioni sensoriali aspecifiche, della tDCS ed rTMS sulle aree cerebrali coinvolte nei processi coscienti, possa avere degli effetti sulla reattività elettroencefalografica (in termini di coerenza EEG) e sul quadro clinico di un gruppo di pazienti in stato vegetativo versus un gruppo di controlli sani.

In secondo luogo, quale area corticale (area dorso laterale prefrontale, area motoria primaria, area parietale versus stimolazione placebo) correlata con l'arousal poteva maggiormente essere influenzata dalla stimolazione a correnti continue.

METODI

Protocollo di stimolazione e registrazione EEG

Ogni soggetto fu esaminato in quattro sessioni da 40 minuti, ad intervalli di 7 giorni per consentire un wash-out dalla precedente stimolazione.

Ogni sessione consisteva in un'acquisizione del segnale EEG in condizioni di riposo per dieci minuti, seguito da 20 minuti di stimolazione transcranica a correnti continue e da ulteriori 10 minuti di registrazione elettroencefalografica al termine della tDCS.

Nel gruppo dei pazienti, all'inizio e alla fine di ogni sessione di stimolazione, venne effettuata la valutazione clinica attraverso tre scale (DRS, JFK, WNSSP). Le scale di valutazione furono eseguite da un medico tenuto in cieco riguardo all'area corticale stimolata.

Le registrazioni furono eseguite con il soggetto posto su una sedia o sulla propria carrozzina con gli occhi chiusi, in riposo, in una stanza con bassa luminosità ed isolata acusticamente.

La stimolazione elettrica fu eseguita tramite lo stimolatore programmabile a corrente continua Eldith DC-stimulator (Neuro Conn, Germany) ad intensità di 1000 μA per una durata di 1200 s. La corrente veniva fornita da una coppia di elettrodi (anodo e catodo) rivestiti da una spugna di ampia superficie (35 cm^2) e coperti da soluzione salina per aumentarne la conduttività. Per evitare ustioni al paziente è stato fissato un limite di 0.1 mA/cm^2 per le applicazioni di corrente continua. L'utilizzo di elettrodi con un'area di superficie di 35 cm^2 con una corrente di $1000\text{ }\mu\text{A}$ applicava una densità di corrente di 0.02857 mA/cm^2 .

La stimolazione elettrica anodale fu somministrata in tre siti diversi secondo il Sistema internazionale 10-20: C3, per l'area M1; P3, per la corteccia parietale;

F3, per la corteccia dorso-laterale prefrontale, F3) ed in una sessione fu utilizzata una stimolazione sham come condizione di controllo. L'ordine delle aree cerebrali stimulate venne controbilanciato tra soggetti.

Analisi EEG

L'acquisizione del segnale EEG venne eseguita tramite 19 elettrodi in Ag/AgCl disposti secondo sistema internazionale 10-20 ad una frequenza di campionamento di 256 Hz. Il segnale è stato sottoposto ad un primo filtraggio mediante l'utilizzo di una Banda Passante (BP) di 1,6-70 Hz.

L'analisi dei tracciati è consistita in un ulteriore filtraggio passa-banda tra 0,5 e 30 Hz. Successivamente, è stata applicata una trasformata Fast Fourier su epoche di 2 sec per ogni registrazione EEG.

Per ogni sito di stimolazione, si è osservato se la rete cerebrale funzionale presenta una struttura di connettività funzionale, in tutte le bande di frequenza EEG: delta (0,5-3,5 Hz), teta (4-7,5 Hz), alfa (8-12,5 Hz), e beta (13-30 Hz), significativamente diversa rispetto ad una configurazione completamente casuale (random). I pattern stimati di connettività funzionale furono caratterizzati da due parametri globali secondo la teoria dei grafi: l'efficienza globale (Eg) della rete, capace di descrivere l'integrazione dei flussi di informazione tra le diverse aree cerebrali, e la modularità misura quanto un network è organizzato in moduli con elevato grado di *clustering* di alto livello. Tale struttura modulare, si costituisce prevalentemente di diversi gruppi di regioni cerebrali funzionalmente simili fra loro.

Le analisi statistiche furono separate per i due gruppi (sani e SV) e per sito di stimolazione effettiva.

Per ogni banda di frequenza e sito di stimolazione effettiva (F3, C3, P3), è stata eseguita un'analisi della varianza a misure ripetute (ANOVA) su ogni misura del grafo, utilizzando "stimolazione" (due livelli: sito effettivo versus Sham) e "tDCS" (due livelli: Pre versus Post) come fattori d'analisi. Nel caso in cui venisse riscontrata un'interazione significativa, verrà utilizzato il t-test a coppie per localizzare in quale sito vi è differenza tra le misure prima e dopo la stimolazione.

RISULTATI

L'ANOVA a misure ripetute calcolata sulla modularità nella banda di frequenza alfa ha rivelato una interazione significativa tra i fattori "stimolazione" e "tDCS" ($p=0,035$), quando veniva applicato lo stimolatore sull'area DLPF nel gruppo di soggetti sani. Le analisi post-hoc mostrarono un aumento significativo della modularità dei network cerebrali (tDCS pre: $0,16\pm 0,007$; tDCS post: $0,21\pm 0,014$) per la stimolazione in DLPF ($p=0,009$) rispetto alla Sham ($p=0,76$) (Fig. 10 e 11). Nessun effetto significativo fu osservato sulle altre bande di frequenza e sito di stimolazione nei due gruppi di partecipanti.

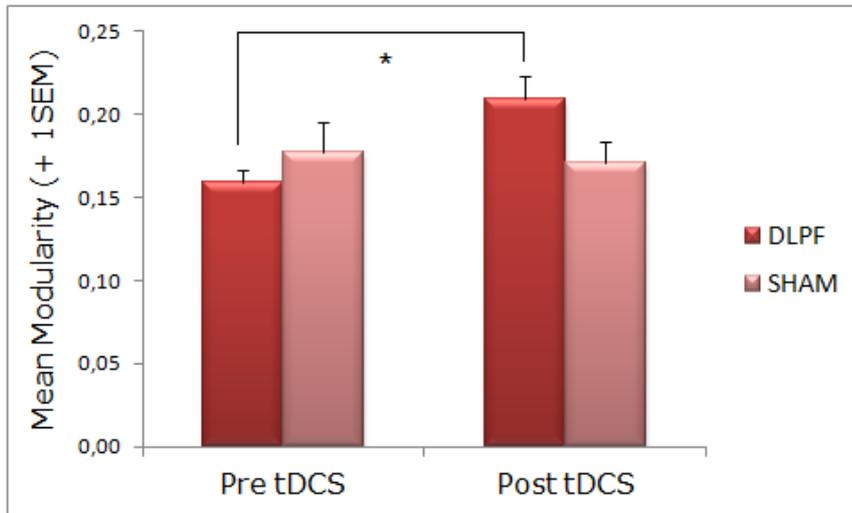


Fig. 10. Modularità dei network cerebrali, prima e dopo stimolazione con tDCS della corteccia dorso laterale prefrontale rispetto alla stimolazione Sham.

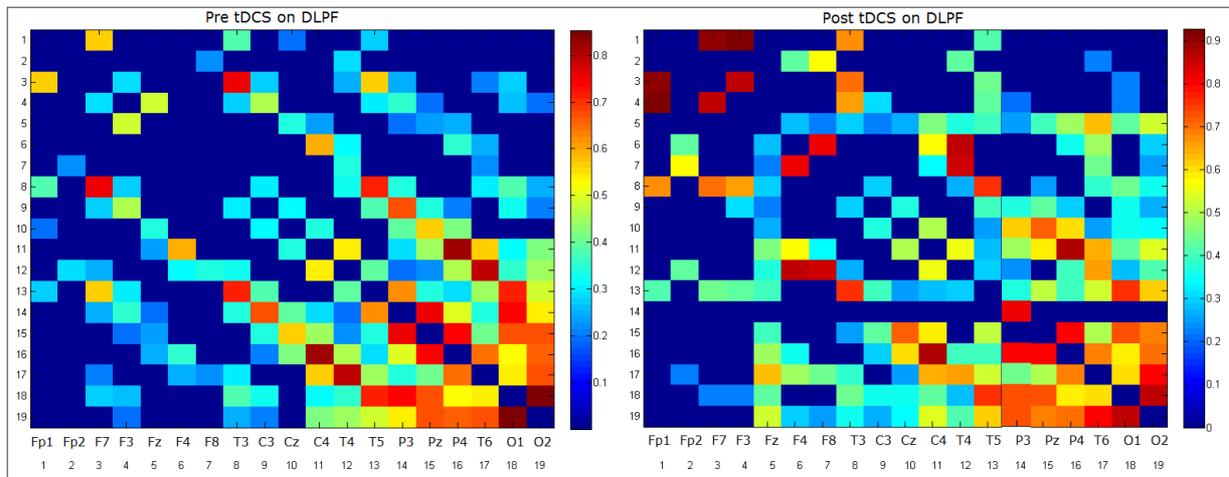


Fig. 11. Mappe di coerenza EEG delle frequenze alfa elaborate mediante l'applicazione della teoria dei grafi. Prima (sinistra) e dopo (destra) la molazione con tDCS sull'area dorso laterale prefrontale. Si evidenzia un aumento significativo delle coerenze (in rosso) frontale e fronto

DISCUSSIONE

Le modificazioni indotte dalla tDCS sulle coerenze in banda alfa dopo stimolazione della corteccia DLPF potrebbero indicare che il range alfa sia fondamentale per la trasmissione delle informazioni tra le aree corticali nei soggetti sani. La maggior modularità suggerisce che l'attività alfa possa essere coerentemente sincrona in diverse aree cerebrali modulari che appaiono sostanzialmente indipendenti l'una dall'altra. Questo meccanismo sembra essere assente o carente nei pazienti in SV.

La stimolazione con tDCS, ma non la stimolazione placebo, eleva la potenza EEG alfa e dimostra la capacità della tDCS di modulare specifiche attività oscillatorie del cervello. La stimolazione a corrente continua potrebbe essere considerata un potenziale strumento per la diagnosi/prognosi nei pazienti in stato di alterata coscienza.

SECONDA FASE: Progetto Regionale RSF 288/08

INTRODUZIONE

Attualmente, la pratica clinica si basa principalmente su stime, derivate da tecniche di imaging standard e valutazioni comportamentali, per la valutazione dello stato di coscienza, senza considerare i possibili fattori confondenti ed i meccanismi alla base della disfunzione cerebrale. Tuttavia, vi è un crescente consenso che la valutazione dei pazienti con alterato stato di coscienza debba includere tecniche che non dipendono da esplicite risposte motorie.

Diverse tecniche sono state usate nel tentativo di aumentare la comprensione dello SV e di prevedere il suo decorso. Recentemente, Schiff et al. (2002) hanno dimostrato che la combinazione di Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), risonanza magnetica funzionale e magnetoencefalografia (MEG) sono in grado di valutare l'elaborazione cerebrale cognitiva nei pazienti non-responsivi. Gli autori hanno identificato alcuni moduli cerebrali isolati che conservano parziali rappresentazioni sensoriali in cinque pazienti in stato vegetativo. Gli autori suggerivano che definiti circuiti, tra cui le connessioni cortico-striato-pallido-talamo-corticali o corticotalamiche, possono essere alla base di network funzionali proencefalici.

Tuttavia, l'uso del neuroimaging è spesso ostacolato da artefatti di movimento che si riscontrano comunemente in pazienti con stato di coscienza alterato. Inoltre, la presenza di impianti metallici, comunemente utilizzati in molti pazienti con grave cerebrolesione, escludono completamente l'uso dei campi

magnetici. Questi aspetti rendono l'analisi e l'interpretazione dei dati difficili, con un conseguente alto tasso di *drop-out*.

L'elettroencefalogramma rappresenta una scelta adatta per superare gli ostacoli derivati dagli artefatti da movimento e la presenza di clips metalliche chirurgiche. Inoltre, tecniche quantitative di EEG, tra cui l'analisi spettrale e la coerenza, consentono di misurare le relazioni funzionali tra due o più regioni corticali e sembrano essere strettamente correlate con le capacità cognitive o comportamentali (Srinivasan e coll., 2007, Van der Hiele e coll., 2007).

L'analisi quantitativa dell'EEG è stata spesso applicata in molti disturbi neurologici per stabilire la prognosi e monitorare l'outcome (Hallett, 1999; Fonseca e coll., 2011). Tuttavia, relativamente pochi studi hanno esplorato la coerenza EEG nei pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza. Davey e coll. (2000) riportarono una coerenza ridotta relativamente all'attivazione talamo-corticale in un paziente che non mostrava alcuna evidenza di coscienza di sé o di un comportamento intenzionale. Gli autori sostennero che un permanente stato di incoscienza potrebbe essere il risultato di un danno dei circuiti cortico-sottocorticali. Infatti, l'attività dei sistemi talamo-corticali media i meccanismi neurali della percezione (Schiff e Plum, 2000). D'altra parte, Laureys e coll. (2006) e Leon-Carrion e coll. (2008) hanno sottolineato l'importanza delle cortecce associative prefrontale-parietali nel determinare il livello di consapevolezza. Gli autori osservarono che, nonostante alcuni stimoli esterni possano ancora indurre significative attivazioni neuronali nei pazienti vegetativi, queste attivazioni sembrano essere limitate alle aree primarie e non si diffondono alle regioni associative di ordine superiore.

Al contrario, altri autori hanno ipotizzato che i pazienti in SV possono, in qualche modo, percepire e di elaborare inizialmente le informazioni (Coleman e coll., 2007; Kotchoubey e coll., 2005). Ciò implicherebbe la presenza di funzioni corticali risparmiate facenti parte alcuni moduli di elaborazione specializzati, anche se indipendenti dall'esperienza cosciente (Schiff e coll., 2000).

I risultati ottenuti sui sei pazienti in stato vegetativo e di minima coscienza hanno dato la spinta per proporre un progetto di ricerca finalizzata alla Regione Veneto per un finanziamento biennale. Lo studio è stato ampliato ad un numero di pazienti più rappresentativo coinvolgendo i centri di Verona, Negrar (Vr), Vicenza, Venezia e Treviso ed è tutt'oggi in corso.

Il progetto così designato prevede l'uso delle stimolazioni somatosensoriali non strutturate, della stimolazione magnetica transcranica e della stimolazione elettrica diretta continua transcranica, per migliorare la diagnosi e la prognosi e per proporre un approccio terapeutico innovativo nei pazienti in stato vegetativo e di minima coscienza. L'area prescelta per le stimolazioni è stata l'area dorso laterale prefrontale sulla base del precedente studio che ha dimostrato come quest'area fosse la più suscettibile alle stimolazioni transcraniche.

METODI

Pazienti

Il disegno sperimentale prevede uno studio pilota, controllato, randomizzato in singolo cieco condotto su 30 pazienti con riferita diagnosi di stato vegetativo o minima coscienza ricoverati consecutivamente presso i centri partecipanti. Di tali

pazienti, tutti parteciparono al protocollo di stimolazione neurosensoriale, 15 a quello di stimolazione tDCS e quattro a quello di stimolazione con rTMS, a causa della mancanza del consenso informato da parte dei tutori legali o della presenza di criteri di esclusione che li esoneravano dallo studio. Dieci volontari sani, bilanciati per sesso ed età, sono stati arruolati come gruppo di controllo.

I partecipanti sono stati sottoposti a:

- Stimolazione neuro-sensoriale (stimoli non strutturati acustici, visivi e nocicettivi);
- Stimolazione a 2mA di tDCS;
- Stimolazione Sham tDCS (placebo);
- Stimolazione ad alta frequenza di rTMS;
- Stimolazione Sham rTMS (placebo).

L'arruolamento dei pazienti è stato condotto nel rispetto dei seguenti criteri di inclusione: (i) Diagnosi di stato vegetativo o stato di minima coscienza definiti attraverso la Disability Rating Scale (di cui si allega copia) con punteggio compreso tra 17 e 29; (ii) età compresa tra 18 e 65 anni; (iii) tempo intercorrente tra lesione ed arruolamento allo studio non inferiore a 4 mesi; (iv) condizioni cliniche stabilizzate da almeno 3 mesi; (v) presenza del modulo di consenso sottoscritto da persona legalmente autorizzata a tale atto, con allegata copia del provvedimento attestante l'autorizzazione. E dei seguenti criteri di esclusione: (i) presenza di alterazioni epilettogene all'elettroencefalogramma e/o pregresse crisi comiziali; (ii) presenza di emorragia cerebrale (o ischemia) in atto; (iii) presenza di impianti intracranici di materiale metallico; (iv) presenza di peacemaker e pompe di Baclofen; (v) presenza di farmaci condizionanti lo stato di coscienza-vigilanza;

Nel disegno sperimentale, ogni paziente arruolato nello studio, ricevette entrambi gli interventi in studio: tDCS (reale e sham) ed rTMS (reale e sham) con sequenza differente definita dalla randomizzazione. Ai pazienti non è stato reso noto se la stimolazione a cui venivano sottoposti era reale o sham.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono state valutate tramite la Disability Rating Scale (DRS), la JFK Coma Recovery Scale (JFK CRS-R) e la Western Neuro Sensory Stimulation Profile (WNSSP) (Allegato 2 e 3).

La scala WNSSP è stata sviluppata per valutare le funzioni cognitive di pazienti con gravi lesioni cerebrali e per monitorare e predire i cambiamenti nei pazienti con alterati stati di coscienza. La scala consiste in 32 items che valutano l'attenzione/risvegli abilità del paziente, la comunicazione espressiva, e la risposta a stimolazione acustica, visiva, tattile ed olfattiva. Si allega copia di tali scale.

Trattamento

Ogni paziente è stato valutato per un arco di tempo di 13 settimane.

La prima settimana è stata dedicata allo studio anamnestico del paziente, alla prima valutazione clinica ed elettroencefalografica ed alla stimolazione neurosensoriale (Fase A del protocollo sperimentale).

Stimolazione sensoriale (A)

	T pre	EEG pre	STIM	EEG	STIM	EEG	STIM	EEG	
									Stim. visiva
minuti	20'	10'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	
									Stim. acustica
minuti	20'	10'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	
									Stim. elettrica
minuti	20'	10'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	

I pazienti sono stati sottoposti a tre blocchi di stimolazione (visiva, acustica e somatosensoriale), così ripartiti:

- 1 minuto di stimolazione -visiva non strutturata (flash di luce a 15Hz).
- acustica (click a polarità alternata, 10 Hz, 90dB)
- somatosensoriale (stimolazione elettrica sovra massimale del nervo Mediano al polso di destra)

1 minuto di registrazione EEG a riposo post-stimolo.

Prima dell'inizio ed alla fine del protocollo di stimolazione, è stato valutato lo stato di coscienza dei pazienti tramite le tre scale di valutazione (DRS, JFK CRS, WNNs) descritte precedentemente.

Stimolazione elettrica a correnti continue (B)



I pazienti sono stati sottoposti a dieci sedute, cinque a settimana, per due settimane di tDCS. Ogni sessione consisteva in 10 minuti di stimolazione.

I partecipanti furono sottoposti a stimolazione tDCS sull'area dorso laterale prefrontale dell'emisfero di destra. La tDCS è stata applicata con tecnica

anodica, con elettrodo attivo posto sopra DLPF e l'elettrodo di riferimento posto in sito extracefalico sul braccio di destra. Intensità di corrente: 2 mA.

Prima dell'inizio ed alla fine del protocollo di stimolazione tDCS, è stata registrata l'attività elettrica cerebrale per 5 minuti. Una valutazione clinica seguì il termine delle sedute di stimolazione.

Al termine delle due settimane, i pazienti furono lasciati a riposo per una settimana per permettere il wash-out dagli eventuali effetti della stimolazione tDCS.

Seguì una stimolazione sham (placebo) della durata di 10 minuti (cinque sedute alla settimana per due settimane). Durante la stimolazione sham, gli elettrodi furono posti nelle stesse aree della stimolazione reale, ma lo stimolatore fu tenuto spento.

Prima dell'inizio ed alla fine del protocollo di stimolazione Sham, fu eseguita la valutazione clinica ed una registrazione elettroencefalografica di 5 minuti.

Successivamente, i pazienti furono lasciati a riposo per due settimane per permettere il wash-out dalla stimolazione elettrica transcranica.

Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (C)

		rTMS1			Sham		
	<i>T pre</i> <i>EEG pre</i>	↓	<i>T post</i> <i>EEG post</i>	...	<i>T1 pre</i> <i>EEG1 pre</i>	↓	<i>T1 post</i> <i>EEG post</i>
Giorni		10		7		10	

I pazienti furono sottoposti ad rTMS che consisteva in 10 minuti di stimolazione, due volte alla settimana, per due settimane.

Durante una delle due sessioni, è stata applicata una stimolazione magnetica reale sopra l'area DLPF di destra. Gli impulsi magnetici venivano erogati tramite uno stimolatore con coil a forma di farfalla di 70-mm ed un'intensità di stimolo al 10% sotto la soglia motoria a riposo dell'abducente breve del pollice. La soglia motoria veniva definita, in accordo con gli standard internazionali, come la minore intensità di stimolo in grado di elicitare un potenziale evocato motorio di ampiezza superiore a 50 μ V nell'abducente breve del pollice controlaterale al lato stimolato.

La frequenza di stimolazione fu impostata a 20Hz in treni di stimolo di 5 secondi, con intervallo inter-treno di stimoli di trenta secondi. Il numero totale di stimoli per sessione fu di 300.

La stimolazione magnetica sarà applicata in accordo con le linee di sicurezza di Wassermann, 1998.

Prima dell'inizio ed alla fine del protocollo di stimolazione rTMS è stata eseguita una valutazione clinica ed elettrofisiologica di ogni paziente.

Dopo una settimana di pausa, per permettere il wash-out dagli eventuali effetti della stimolazione rTMS.

Nelle due settimane successive, i pazienti furono sottoposti ad una stimolazione sham (placebo) di 10 minuti cinque volte alla settimana per due settimane. Durante la stimolazione sham, il coil collegato allo stimolatore veniva posto nelle immediate vicinanze del paziente, mentre un coil non collegato all'apparecchiatura veniva posto sullo scalpo del paziente.

Prima dell'inizio ed alla fine del protocollo di stimolazione tDCS, ogni paziente veniva sottoposto a valutazione clinica ed elettroencefalografica.

Registrazione EEG

L'elettroencefalogramma è stato acquisito seguendo le modalità descritte nella prima fase del terzo esperimento.

Per l'analisi dei dati raccolti, il segnale EEG è stato filtrato con filtro passa-banda 1.6 – 50 Hz ed in seguito suddiviso in epoche di due secondi.

Sono state rimosse le aree chiaramente rappresentanti artefatti di natura bioelettrica (EOG, EMG), tramite la scomposizione delle componenti indipendenti (ICA).

Per ogni soggetto, è stata eseguita l'analisi spettrale di potenza basata sulla trasformata di Fourier (FFT) tramite periodogramma di Welch (smoothing temporale tramite finestra di Blackman Harris; sovrapposizione temporale: 1 sec).

La lunghezza dei periodi usati come input per l'FFT sono stati di 2 sec. La sincronizzazione/desincronizzazione (ERD) delle bande di frequenza EEG è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:

$$ERD = (E - R)/R \times 100$$

dove E indica la densità di potenza dopo tDCS ed R la densità di potenza a riposo. La coerenza, una misura della sincronia tra due diverse attività neuronali, è stata calcolata come segue:

$$I_{xy}^2(f) = \frac{(G_{xy}(f))^2}{(G_{xx}(f)G_{yy}(f))}$$

in cui $G_{xy}(f)$ è il cross-spettro delle due serie temporali, G_{xx} e G_{yy} sono invece gli auto-spettri.

Nel caso in esame, le due serie temporali sono i segnali registrati da due differenti elettrodi. Per tale motivo, la coerenza è stata calcolata rispetto tutte le possibili coppie di elettrodi per le seguenti bande in frequenza: delta (< 4 Hz), theta (4 – 7 Hz), alpha (8 – 12 Hz), beta (13 – 30 Hz) ed infine gamma (> 30 Hz).

Al fine di discriminare tra connessioni a breve e lunga distanza, sono stati mediati un network anteriore che comprendeva gli elettrodi Fp1, Fp2, F3, F4, Fz, F7 ed F8 ed un network posteriore che comprendeva T5, T6, P3, Pz, P4, O1 and O2 per ottenere due gruppi di connessioni a breve distanza (frontale e parietale) ed uno a lunga distanza (fronto-parietale).

È stata implementata una trasformata Z di Fisher dei valori di coerenza di ogni banda per ogni derivazione per normalizzare la distribuzione dei valori di coerenza.

La differenza tra gruppi è stata valutata attraverso un'analisi della varianza (ANOVA) a misure ripetute per ogni tipo di stimolazione e di banda di frequenza, ed includeva i seguenti fattori: "condizione" (reale vs sham); "tempo" (prima vs dopo la stimolazione); "localizzazione" (frontale vs parietale vs fronto-parietale). Le variazioni delle scale di valutazione clinica tra prima e dopo le stimolazioni tDCS e Sham verranno analizzati tramite il t-test a misure ripetute.

La correlazione tra misure elettrofisiologiche e scale cliniche è stata eseguita tramite un test di correlazione di Pearson.

Sono state considerate statisticamente significative le differenze aventi un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

Correlati clinici

Dal punto di vista clinico, i pazienti non presentavano alcuna variazione statisticamente significativa delle scale utilizzate per la valutazione dello stato di coscienza né dopo stimolazione somatosensoriale né dopo protocollo tDCS.

Ciononostante, i caregivers osservarono una riduzione della fluttuazione della coscienza da parte dei pazienti dopo stimolazione con tDCS, al contrario della stimolazione Sham in cui non veniva riportata alcuna variazione del quadro clinico. I familiari non riportavano un miglioramento della reattività del paziente, bensì una maggior stabilità in termini di vigilanza e reattività.

Per quanto riguarda le correlazioni tra scale di valutazione cliniche e dati neurofisiologici di coerenza EEG, non è stata trovata una correlazione tra la gravità dello stato vegetativo e le variazioni nella coerenza, sia prima che dopo stimolazione con tDCS e Sham.

Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione somatosensoriale

(i) Coerenza EEG in stato di riposo

I valori di coerenza EEG a riposo nei controlli sani e nei pazienti in stato vegetativo non hanno mostrato significative differenze di gruppo in tutte le bande di frequenza.

(ii) Coerenza EEG dopo stimolazione

Le variazioni significative di coerenza EEG dopo stimolazione sensoriale per i due gruppi sono rappresentate in Fig. 12.

Sommariamente, sono state riscontrate differenze significative delle coerenze EEG nelle bande di frequenza più basse nei controlli sani, mentre i pazienti in stato vegetativo hanno mostrato una maggiore coerenza EEG nelle frequenze rapide alfa e gamma.

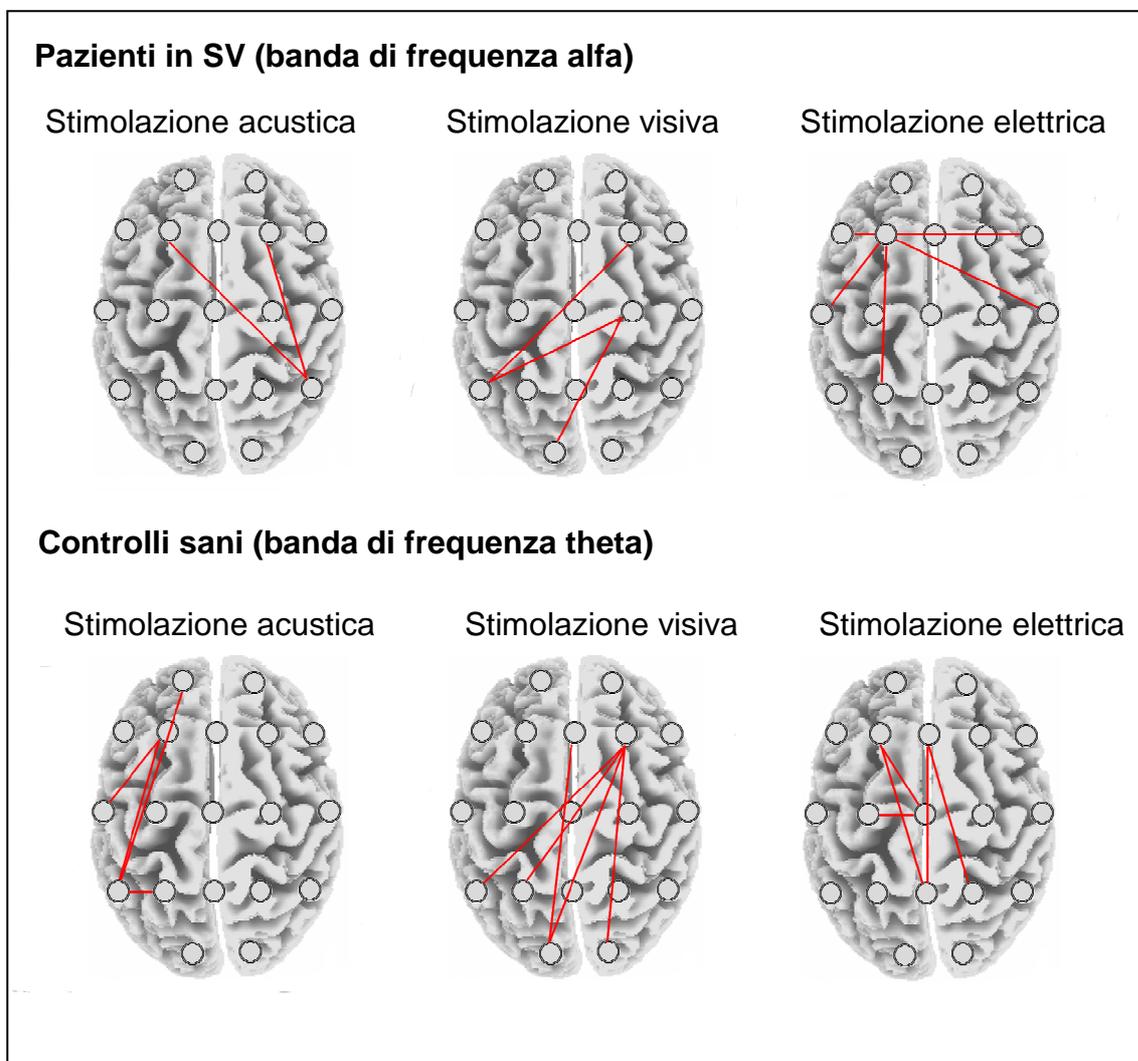


Fig. 12. Schematizzazione delle variazioni statisticamente significative delle coerenze EEG nei pazienti in stato vegetativo e nei controlli sani prima e dopo stimolazione sensoriale.

a. Stimolazione visiva

L'analisi della varianza a misure ripetute ha rivelato effetti di gruppo significativi per le coerenze in banda alfa ($F_{1,8}=8.5$, $p=0.011$), gamma ($F_{1,8}=5.5$, $p=0.03$) e delta ($F_{1,8}=8.0$, $p=0.015$). L'analisi post-hoc ha indicato che i pazienti in SV avevano coerenze EEG significativamente più elevate nelle coppie di elettrodi F4-T5, T5-C4 e C4-O1 in banda alfa ($p=0.03$, $p=0.03$ e $p=0.02$, rispettivamente). Inoltre, sono stati rilevati valori di coerenza più elevati in F4-Cz, Pz-F4 e F8-T5 ($p=0.03$, $p=0.04$ e $p=0.04$, rispettivamente) per la banda gamma. Il gruppo di controllo ha mostrato una coerenza EEG significativamente più alta in Fz-O1, F4-T5, F4-P3, F4-O1, O2-F4 ($p=0.03$, $p=0.03$, $p=0.04$, $p=0.01$, $p=0.02$ rispettivamente) per banda delta.

b. Stimolazione acustica

Dopo stimolazione acustica, le differenze di gruppo significative sono state osservate nelle bande di frequenza alfa ($F_{1,4}=5.3$, $p=0.03$) e delta ($F_{1,4}=7.0$, $p=0.04$). Un successivo t-test ha dimostrato che i pazienti in SV avevano una coerenza significativamente maggiore per le bande di frequenza alfa in F3-T6 e F4-T6 ($p=0,04$). Il gruppo di controllo aveva una più alta coerenza nella banda di frequenza delta per le coppie di elettrodi FP1-T5, T3-F3, F3-T5 e T5-P3 ($p=0.04$, $p=0.03$, $p=0.04$, $p=0.03$).

c. La stimolazione elettrica

Dopo stimolazione elettrica periferica, si sono osservate differenze significative tra i due gruppi per le frequenze theta ($F_{1,4}=6.2$, $p=0,03$), alfa ($F_{1,4}=6.9$, $p=0.04$) e gamma ($F_{1,4}=8.7$, $p=0.01$). Le analisi post-hoc hanno

mostrato che i pazienti in SV avevano una coerenza significativamente più alta dopo stimolazione elettrica in F3-F7, F8-F3, F3-T3, T4-F3, F3 e-P3 ($p=0.01$, $p=0.02$, $p=0.04$, $p=0.03$, e $p=0.04$) per la banda alfa. Le frequenze in gamma erano significativamente inferiori nei pazienti rispetto al gruppo di controllo in F7-T5, F4-Cz, F4-C4, F4-Pz, F4-P4, C3-T5, e C3-Pz ($p=0.05$, $p=0.01$, $p=0.03$, $p=0.03$, $p=0.03$, $p=0.04$ e $p=0.03$, rispettivamente). Infine, i controlli hanno mostrato una maggiore coerenza EEG che è stata osservata nelle coppie di elettrodi F3-Cz, Pz-F3, Fz-Pz, Fz-P4, e C3-Cz ($p=0.03$, $p=0.03$, $p=0.02$, $p=0.01$, e $p=0.04$) per la banda theta.

Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione a corrente elettrica continua

Dal punto di vista elettroencefalografico, si è riscontrato un significativo aumento delle coerenze elettroencefalografiche a seguito di stimolazione con tDCS. L'analisi della varianza ha rivelato una interazione 'condizione' x 'tempo' x 'localizzazione' ($F_{392,10976}=5.50$, $p=0.015$). Come evidenziato dalla figura 13, le frequenze rapide Beta e Gamma hanno mostrato un aumento della coerenza nel network frontale dopo stimolazione con tDCS ($p=0.02$ e $p=0.01$, rispettivamente). Per quanto riguarda le connessioni fronto-parietali a lungo raggio, si è osservato un aumento delle coerenze in banda Beta e Gamma dopo tDCS ($p=0.03$ e $p=0.015$, rispettivamente).

La stimolazione Sham non ha indotto alcuna variazione significativa nelle coerenze a breve e lunga distanza.

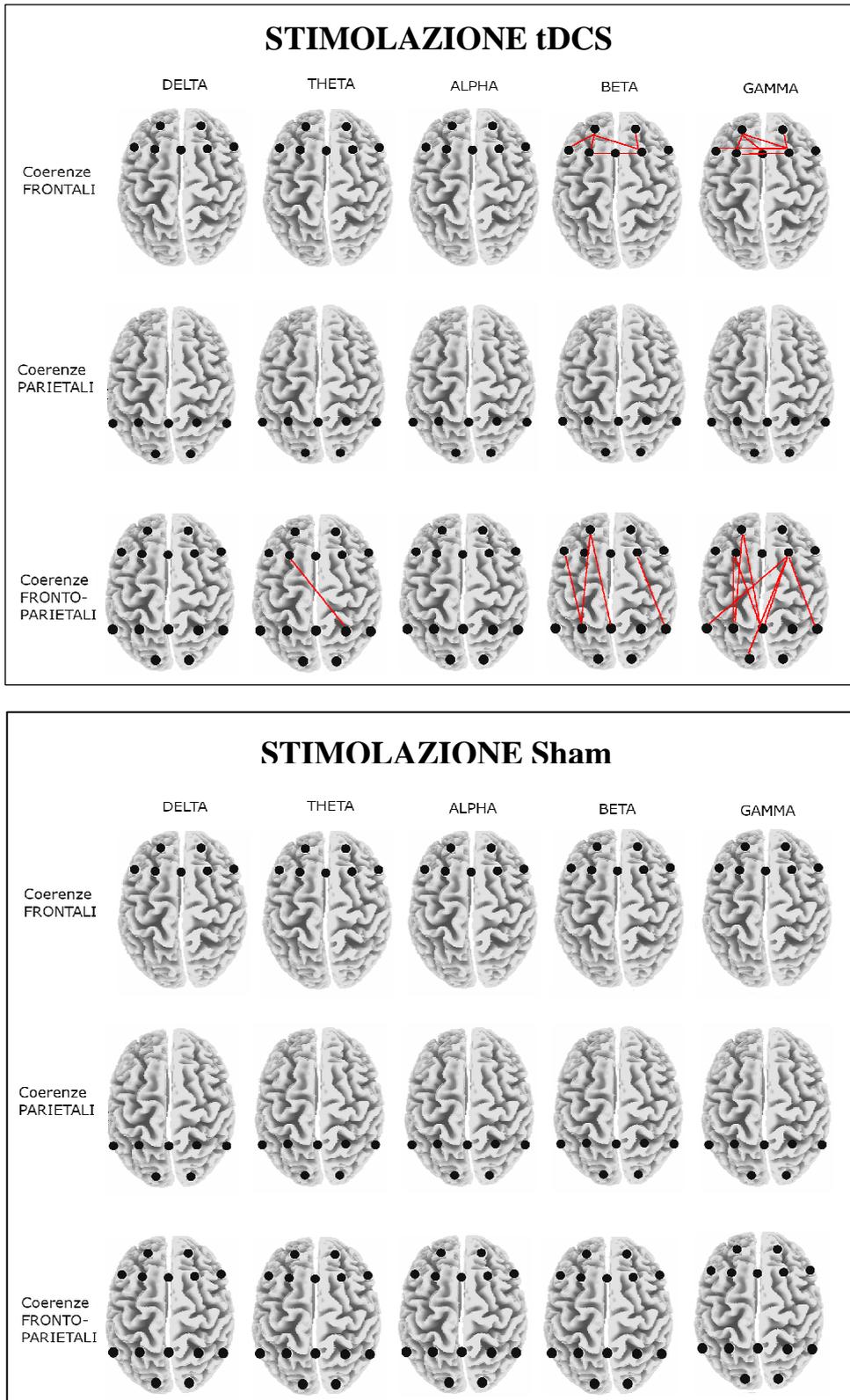


Fig. 13 Schematizzazione della variazione delle coerenze EEG per ogni banda di frequenza dopo la stimolazione con tDCS nel gruppo di pazienti e di pazienti in stato.

Correlati elettrofisiologici dopo stimolazione magnetica transcranica

A causa delle controindicazioni relative all'applicazione della stimolazione magnetica transcranica, solo tre pazienti poterono seguire il protocollo rTMS. In uno dei tre casi potè essere descritta l'insorgenza di una crisi epilettica a distanza di tre ore dalla stimolazione ripetitiva transcranica.

Lunghi periodi di stimolazione con rTMS in giorni consecutivi si presume comportare ad un accumulo di effetti comportamentali cumulativi (Baumer et al., 2003). Numerosi studi hanno dimostrato tali duraturi cambiamenti attraverso misure elettrofisiologiche e metaboliche (Valero-Cabre e Pascual-Leone, 2005). Infatti, la registrazione di attività bioelettrica cerebrale durante e dopo la stimolazione transcranica ha permesso di quantificare la durata dell'*after-effect* in termini di aumento della desincronizzazione o della potenza/coerenza del segnale, anche in assenza di cambiamenti comportamentali.

D'altra parte, studi sull'*after-effect* hanno sottolineato come la rTMS possa potenzialmente indurre anomalie epilettiformi persistenti all'EEG, dopo la fine della stimolazione. Infatti, la rTMS può comportare un aumento dell'eccitabilità neuronale locale ed una maggiore suscettibilità alle convulsioni. Una volta che le modificazioni neurali sono in atto, possono persistere per settimane. Questo effetto duraturo probabilmente riflette modificazioni a lungo termine dei circuiti neuronali.

In genere, l'insorgenza di figure epilettiformi dopo stimolazione è improbabile si verifichi in soggetti sani ed è stato raramente descritto in pazienti affetti da diversi disturbi neurologici o psichiatrici. Tuttavia, è noto che pazienti

con storia di lesioni cerebrali potrebbero avere un potenziale aumentato rischio di convulsioni durante o immediatamente dopo rTMS (Rossi et al., 2009).

Dopo l'inizio del trattamento con rTMS, un paziente di 31 anni ebbe una crisi parziale secondariamente generalizzata, tre ore dopo la quarta seduta di rTMS a 20Hz applicata alla corteccia dorso-laterale prefrontale (DLPFC).

Otto mesi prima, il paziente era stato ricoverato urgentemente in un reparto di terapia intensiva per una grave cerebrolesione traumatica. La risonanza magnetica in fase acuta aveva rivelato un ematoma diffuso nel corpo calloso con effetto massa sul quarto ventricolo ed idrocefalo a monte. Il paziente presentava uno stato di coma con alternanza di posture in decerebrazione e decorticazione ed un punteggio alla Glasgow Coma Scale di 4. Dopo due settimane dall'evento, iniziò ad aprire gli occhi spontaneamente ed eseguire comandi semplici, come ad esempio lo stringere la mano dell'esaminatore. La MRI mostrava l'assorbimento dell'ematoma ed una riduzione dell'idrocefalo e rilevava lievi lesioni contusive frontali e parietali.

Dopo essere stato trasferito al nostro centro di Neuroriabilitazione, il paziente, mostrando stabilità delle condizioni cliniche e compatibilità con i criteri di inclusione ed esclusione, fu arruolato nello studio di stimolazione transcranica.

Una valutazione accurata indicava che né il paziente né la sua famiglia avevano una storia di epilessia. L'elettroencefalogramma registrato in fase di arruolamento non mostrava alcuna attività epilettiforme o parossistica, ma un quadro di rallentamento diffuso (Fig.14A).

Tre ore dopo la quarta seduta di rTMS, il paziente ebbe una crisi avversiva seguita da una crisi generalizzata secondaria, della durata di circa tre minuti. L'attacco è stato inizialmente caratterizzato da una torsione della testa verso

destra, l'estensione tonica dell'arto superiore destro seguita da una completa perdita di coscienza. Dopo la crisi, il paziente non fu in grado di eseguire comandi semplici per le due ore successive. L'EEG, registrato circa un'ora dopo l'evento, mostrò un rallentamento diffuso con focali scariche di punte e poli-punte prevalentemente nelle regioni fronto-centrali di sinistra (Fig.14B). Due giorni dopo la crisi, un secondo EEG non mostrò alcuna attività epilettiforme ed un ripristino dell'attività elettrica cerebrale del paziente (Fig.14C). In seguito, i familiari riferirono che il ragazzo non ebbe ulteriori crisi e cambiamenti clinici.

Questo caso ci suggerì alcune importanti questioni riguardo i parametri di sicurezza della rTMS. In genere, le convulsioni sono causate dall'induzione di una iper-sincronizzazione di gruppi di neuroni durante o immediatamente dopo rTMS. L'insorgenza di crisi epilettiche nel periodo di *after-effect* dovuto alla modulazione dell'eccitabilità corticale non è ancora mai stata confermata.

Nel paziente che abbiamo descritto, abbiamo potuto osservare una tardiva crisi avversiva dopo quattro sessioni di rTMS. La somministrazione di sessioni quotidiane di stimolazione, pur essendo nei parametri di sicurezza, sembra provocare un duraturo effetto fisiologico cumulativo. Questo processo può consistere sia nella riorganizzazione degli assoni eccitatori che nella modificazione delle proprietà intrinseche di membrana, come una modificazione della funzione dei recettori del glutammato o dell'inibizione recettore-mediata del GABA A. Inoltre, studi preliminari hanno dimostrato che la stimolazione della corteccia DLPF può influenzare i livelli di glutammato corticale vicino al sito di stimolazione e in regioni remote del cervello, e contribuire efficacemente all'epilettogenesi.

Nonostante l'insorgenza di crisi epilettiche sia rara utilizzando stimolazioni ad intensità sotto soglia, la somministrazione giornaliera di rTMS potrebbe eventualmente produrre attività parossistiche, convulsioni e crisi epilettiche. I parametri di stimolazione scelti per il nostro studio, considerati "sicuri" secondo le linee guida del 1998 sulla sicurezza nell'utilizzo della rTMS, potrebbero non operare entro standard di sicurezza nei pazienti con disturbi cerebrali, seppur con anamnesi negativa di pregresse crisi convulsive. D'altra parte, Wassermann si riferì alla massima durata di singoli treni di TMS, ma non menzionò le procedure di sicurezza relative agli intervalli inter-treno od il numero massimo di treni di stimolazione ripetitiva in un trattamento. Alcune indicazioni relative all'uso di sicurezza sulla rTMS possono essere trovate nelle più recenti linee guida, in cui gli autori hanno dichiarato che treni di rTMS sono potenzialmente in grado di aumentare il rischio di convulsioni in pazienti con lesione cerebrale, anche in assenza di storia di epilessia, e senza farmaci anticonvulsivanti (Rossi et al ., 2009). Il beneficio clinico, in questo caso, dovrebbe sempre prevalere sul rischio del paziente sottoposto ad rTMS. Nel nostro caso, abbiamo ritenuto che la potenziale possibilità di migliorare la coscienza nei pazienti in SV o SMC possa controbilanciare gli effetti avversi dell'uso della rTMS. Tuttavia, un attento monitoraggio del paziente sarebbe sempre consigliato. Per ridurre il rischio di insorgenza di crisi epilettiche nei successivi pazienti arruolati nello studio, è stato rivalutato il protocollo di stimolazione rTMS utilizzando dei parametri di stimolo più cauti. Le sessioni di rTMS furono eseguite a giorni alterni, con una frequenza di stimolo di 10 Hz ed aumentando l'intervallo inter-treno di un minuto. Dopo la successivamente arruolati nel protocollo di studio.

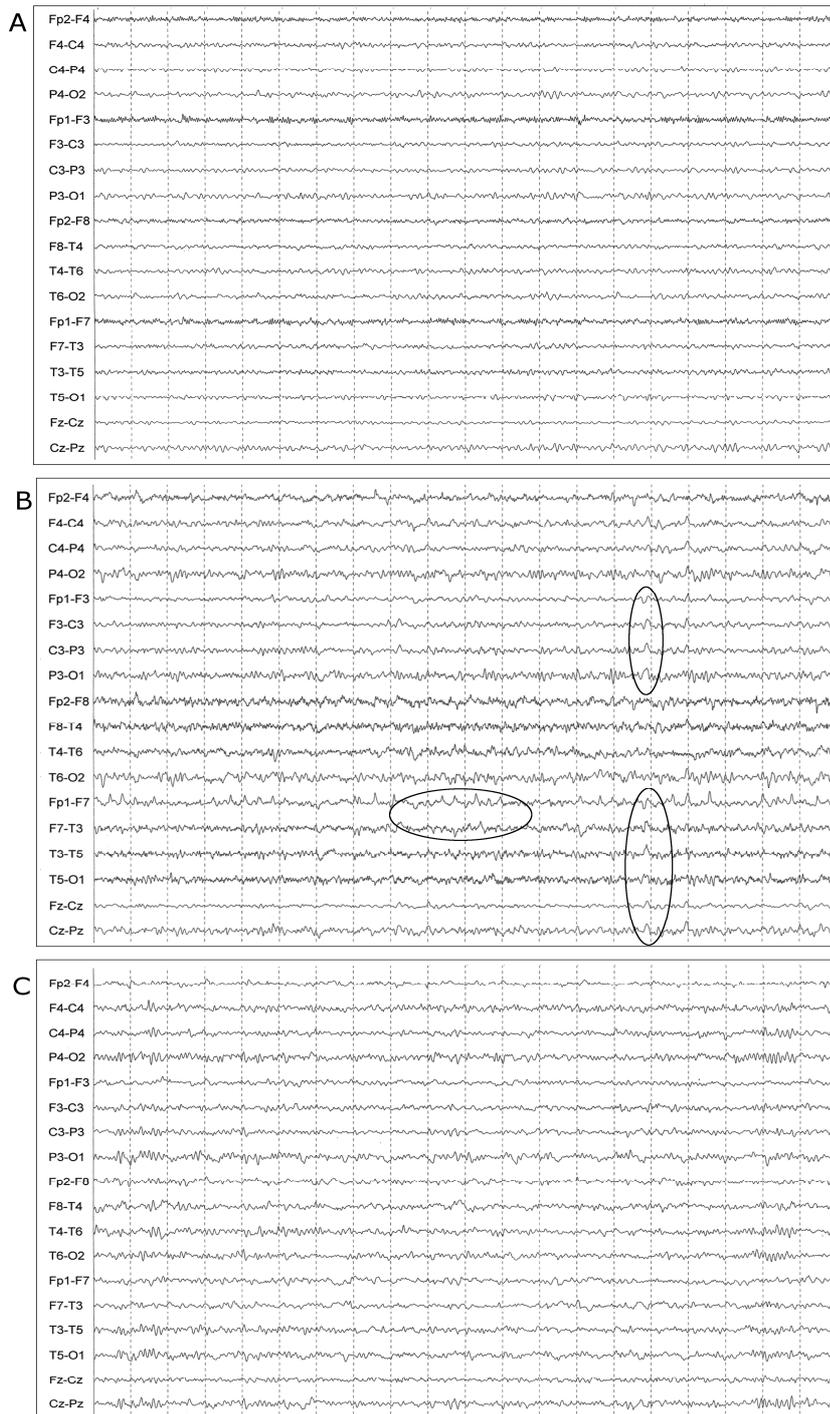


Fig. 14. Segmenti di tracciato elettroencefalografico. (A) Prima dell'inizio del trattamento con stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS). La traccia EEG mostra un rallentamento diffuso dei ritmi. (B) dopo la quarta seduta di rTMS a 20 Hz, i marker mostrano punte onda a distribuzione diffusa e predominanza frontale, in corrispondenza della zona di stimolazione. (C) Due giorni dopo la crisi epilettica, l'EEG non mostra attività epilettiforme e un ripristino dell'attività elettrica di base.

DISCUSSIONE

L'approccio utilizzato nel presente studio consiste nel confrontare le caratteristiche cliniche dei pazienti in stato vegetativo con l'organizzazione temporo-spaziale dell'attività elettroencefalografica spontanea al fine di individuare e valutare i cambiamenti funzionali derivati dalla stimolazione sensoriale e transcranica dell'encefalo.

In questa direzione, numerosi studi hanno utilizzato misure funzionali dell'attività cerebrale, come la f-MRI. Tuttavia, il rumore della risonanza ed i movimenti spontanei del paziente possono rendere la registrazione difficoltosa ed interferire con i risultati. In alternativa, l'analisi quantitativa dell'EEG può in parte superare questo ostacolo. Tra le altre, la coerenza EEG rappresenta una tecnica innovativa per misurare quantitativamente la dipendenza lineare tra due regioni cerebrali fisicamente lontane e perciò può essere espressione delle transizioni funzionali dinamiche tra i segnali cerebrali (Shaw e coll., 1978).

Alte coerenze tra segnali EEG provenienti da diverse aree cerebrali indicano un'aumentata interazione funzionale tra diversi network neuronali.

Alcuni studi hanno utilizzato l'analisi quantitativa EEG nel tentativo di definire le basi strutturali dello stato vegetativo o discriminare tra diversi livelli di coscienza (Leon-Carrion e coll., 2008; Adams e coll., 2000). Nei casi sopra elencati, l'attività cerebrale veniva registrata in condizioni di riposo. Nel presente studio, invece, ci siamo posti l'obiettivo di osservare e valutare le variazioni dello stato di coscienza dopo stimolazione sensoriale e transcranica sia da un punto di vista clinico che della dinamica dell'attività bioelettrica cerebrale.

I pazienti con stato di coscienza alterato possono essere spesso risvegliati o girare i loro occhi o la testa in risposta a stimoli importanti. Questa capacità può essere spiegata con la mediazione di sistemi corticali e del tronco encefalico (Laureys e coll., 2000). L'uso dell'analisi di coerenza EEG può rilevare la possibile persistenza di attività parzialmente integra nei network neuronali, permettendo di valutare le proprietà che sono alla base dell'espressione dei comportamenti frazionati osservati in VS.

Qui, l'analisi quantitativa EEG ha mostrato che l'impatto delle attività theta e delta nei soggetti sani è stata significativamente più alta rispetto ai pazienti in stato vegetativo. In tutte le modalità sensoriali, è stato osservato un miglioramento considerevole della coerenza a lungo raggio fronto-parietale nelle frequenze lente nei controlli sani. Viceversa, i pazienti hanno mostrato un aumento locale di connettività alfa. In particolare, le connessioni a breve raggio alfa aumentarono nelle regioni fronto-temporali dopo stimolazione uditiva e nelle regioni centro-posteriori dopo gli stimoli visivi. Tuttavia, la stimolazione elettrica periferica ha evocato un miglioramento della coerenza fronto-parietale in banda alfa ed una riduzione della connettività fronto-centrale in gamma.

L'informazione sensoriale è noto essere propagata lungo diversi canali di ingresso alla corteccia. Per essere utilizzati in modo efficiente, tali informazioni devono essere integrate con altre informazioni sensoriali e vincoli interni, come ad esempio aspettativa e ricordi recenti. Questa integrazione segue un processo di elaborazione top-down che evolve con dinamiche temporale nel campo delle basse frequenze (Schürmann, 1994). Infatti, le oscillazioni teta sono correlate a risposte coordinate che indicano l'*arousal* e la prontezza ad elaborare le informazioni (Başar e coll., 2001). L'aumento della coerenza fronto-parietale a

lungo raggio nelle frequenze teta nei controlli sani potrebbe essere positivamente correlata con la capacità di codificare nuove informazioni riflettendo l'attivazione di loop ippocampo-corticali (Klimesch e coll., 1999). Infatti, nell'ippocampo, la ritmicità teta domina l'EEG selettivamente durante la veglia e può giocare un ruolo importante nell'accoppiamento funzionale di strutture separate e fisicamente lontane responsabili di diverse fasi del processo di costruzione della memoria (Vanderwolf, 1969)

Pertanto, l'aumento di coerenza fronto-parietale trovato in frequenza teta potrebbe rappresentare l'interazione tra la corteccia associativa posteriore, dove si ritiene le informazioni sensoriali vengano memorizzate, e la corteccia prefrontale, dove si ritiene che le informazioni correnti pertinenti vengano continuamente aggiornate.

D'altra parte, i pazienti in SV hanno mostrato un aumento locale di coerenza alfa dopo le stimolazioni visive e uditive. La connettività a breve raggio sembra riflettere il "viaggio" del ritmo alfa o delle onde più rapide che possono essere un correlato funzionale di attività strettamente locale (von Stein e Sarnthein, 2000). Questo potrebbe ulteriormente confermare l'ipotesi che i pazienti in stato vegetativo accertato possano attivare cortecce somatosensoriali primarie, ma non aree multimodali di ordine superiore, che appaiono scollegate (Boly e coll., 2004; Laureys e coll., 2000). I network fronto-parietali sembrano essere un requisito necessario per la coscienza e l'elaborazione sensoriale. Infatti, l'interazione dinamica tra la corteccia dorsolaterale prefrontale e la corteccia parietale, vicino o lungo il solco intraparietale, è stato costantemente dimostrato essere reclutata da compiti che coinvolgono processi di controllo top-down dell'attenzione e durante processi di elaborazione dello stimolo bottom-up

(Corbetta e Shulman, 2002). Una disconnessione funzionale della corteccia sensoriale primaria dai network associativi corticali suggerisce una mancanza di integrazione delle informazioni e l'assenza di una percezione cosciente (Boly e coll., 2005)

Comportamenti differenti sono stati osservati dopo la stimolazione elettrica del nervo mediano. I pazienti in SV hanno mostrato un aumento di coerenza alfa tra le regioni frontali di sinistra e le zone ipsi- e controlaterali fronto-temporali e posteriori. Secondo Cooper e coll. (2005), la stimolazione nervosa elettrica sembra agire come un cancello di entrata periferico al sistema nervoso centrale attraverso sinapsi tra la componente spino-reticolare del nervo mediano ed i neuroni del sistema reticolare ascendente. I meccanismi di azione centrale includono un aumento del flusso ematico cerebrale e livelli più elevati di dopamina e noradrenalina (Moriya e coll., 2000).

Nello stato vegetativo, la stimolazione elettrica periferica potrebbe servire da catalizzatore per migliorare temporaneamente le funzioni del sistema nervoso e migliorare le connessioni cortico-corticali fronto-parietali. In generale, è noto che i pazienti in SV perdono la loro capacità di elaborare e differenziare gli stimoli a causa della limitata selezione di informazioni sensoriali che arrivano dal talamo al proencefalo. Il rilascio di dopamina dopo stimolazione elettrica periferica potrebbe consentire una modulazione inibitoria transitoria sulla elaborazione sensoriale che può essere mediata da connessioni corticali fronto-parietali (Yamaguchi e Knight, 1990).

Dopo stimolazione con corrente elettrica continua sull'area dorso-laterale prefrontale di sinistra, si è notato un marcato aumento delle coerenze delle frequenze rapide. Fuster e coll (1982) trovarono che alcuni neuroni della

corteccia prefrontale aumentano la loro attività quando viene presentato al soggetto un segnale e continuano a “scaricare” anche una volta che il segnale cessa. Immagini di risonanza magnetica funzionale e PET indicano che la corteccia prefrontale gioca un ruolo cruciale durante compiti di memoria di lavoro. La memoria di lavoro si riferisce all'immagazzinamento temporaneo ed alla elaborazione delle informazioni necessarie per eseguire compiti più complessi come la comprensione del linguaggio, l'apprendimento ed il ragionamento. La corteccia DLPF è inoltre fortemente connessa con molte aree corticali e sottocorticali. In particolare, sono state documentate interazioni anatomiche e funzionali con la corteccia prefrontale mediale, inclusi il cingolo anteriore e la corteccia orbito frontale. Tali strutture sono strettamente correlate con funzioni psichiche come emotività, comportamento e memoria a lungo termine.

L'influenza positiva della tDCS sullo stato di coscienza nella maggior parte dei pazienti in Stato Vegetativo arruolati nello studio conferma che la stimolazione apportata sulla corteccia prefrontale di sinistra ha effetti anche sui circuiti neuronali deputati alla coscienza.

Quello che si è riscontrato dopo la stimolazione a corrente continua è stato un aumento della coerenza EEG per le alte frequenze nelle regioni frontali e nelle regioni fronto-parietali.

La coscienza è concepita come un sistema globale dinamico in cui nuove esperienze vengono costruite su rilevanti elementi pre-costituiti. Questo punto di vista è coerente con l'idea che la coscienza è principalmente caratterizzata da dinamicità, selettività, ed esperienza soggettiva (Tononi, 2004). L'esperienza sarebbe così definita dall'integrazione dominante di neuroni funzionalmente interconnessi tra loro in un dato momento. Qualsiasi processo richiederebbe

continui e complessi riarrangiamenti di popolazioni neurali appartenenti a diverse regioni corticali, un compito che è stato attribuito a tipiche dinamiche oscillatorie. Da numerosi studi, sembra che la sincronizzazione in banda gamma (30 Hz a 50 Hz) tra diversi gruppi neurali rappresenti un meccanismo di integrazione funzionale dinamica nel cervello ed è stato suggerito essere la base biologica dell'esperienza percettiva. La sincronizzazione dei ritmi rapidi consente una transitoria integrazione funzionale tra specifici gruppi neurali, poiché vi è un costante scambio di potenziali d'azione da parte delle membrane dei neuroni riceventi, rafforzando in tal modo la comunicazione tra le popolazioni neuronali che oscillano sincronamente (Fries, 2005).

Lo studio delle frequenze gamma ha sempre portato un elevato interesse nel mondo delle neuroscienze, associandola a meccanismi di elaborazione percettiva, ed altre funzioni cognitive come l'attenzione, il riconoscimento degli oggetti, la percezione del linguaggio e la coscienza.

La sincronizzazione in banda beta/gamma si è ipotizzato essere alla base della consapevolezza cosciente attraverso l'attività integrata di network neuronali tra diverse aree cerebrali. Sebbene studi su animali e uomini abbiano fornito qualche forma di supporto a questa ipotesi, la relazione tra coerenza della banda gamma e compiti cognitivi che richiedono una percezione cosciente rimane ancora controversa. La percezione cosciente è uno stato soggettivo intrinseco. Studi sulla coerenza gamma durante compiti percettivi è stata valutata in uno studio usando EEG associato a magnetoencefalografia (MEG) (Joliot et al., 1994; Rodriguez e coll., 1999). Tuttavia i risultati non rappresentano un pattern uniforme. Esistono marcate differenze topografiche che non riescono ad essere spiegate dai diversi compiti utilizzati nei protocolli di sperimentazione. Per

esempio, alcuni studi MEG hanno riportato attività gamma continua durante lo stato di veglia, diffusa su tutto lo scalpo, con una fase antero-posteriore, ma un tale risultato non si è riscontrato negli studi che hanno impiegato l'EEG.

Recenti ricerche hanno impiegato l'uso di registrazioni elettrocorticografiche ed hanno riscontrato differenze tra stati comportamentali e risposte gamma in risposta a diversi compiti cognitivi. La banda gamma può dissociarsi dalle altre bande di frequenza EEG ed ha una distribuzione topografica più costante.

Sebbene la coerenza gamma si sia maggiormente riscontrata in popolazioni neuronali distanti tra loro, alcuni studi hanno trovato un aumento di coerenza solo tra neuroni molto vicini (Menon e coll., 1996; Gross and Gotman, 1999).

Nel nostro studio, la presenza di un aumento di coerenza nella banda beta/gamma nelle regioni frontali (a breve raggio) sarebbe ad indicare l'attivazione della corteccia che si trova nelle immediate vicinanze dello stimolatore elettrico. Più interessante invece risulta l'incremento della coerenza EEG della banda beta/gamma dopo tDCS tra le regioni frontali e parietali.

L'informazione sensoriale è risaputo propagarsi lungo vari canali afferenti alla corteccia. Per essere efficacemente utilizzata, l'informazione dovrebbe essere integrata con altre informazioni sensoriali e filtri interni, quali l'aspettativa e la memoria a breve termine. Questa integrazione segue un'elaborazione top-down che si sviluppa con dinamiche temporali nel range delle frequenze rapide. Infatti, le attività beta e gamma sono correlate a risposte coordinate volte a meccanismi di risveglio o prontezza a processare l'informazione.

L'aumento della coerenza beta e gamma fronto-parietale a lungo raggio potrebbe correlare positivamente con l'abilità del paziente di codificare nuove informazioni e riflettere l'attivazione di circuiti di feedback cortico-ippocampali

(Klimesch e coll., 1996). Infatti, nell'ippocampo, l'attività rapida domina l'EEG selettivamente durante l'esplorazione dell'ambiente e può giocare un ruolo importante nell'integrazione funzionale tra strutture lontane responsabili delle diverse componenti deputate ai processi di memoria.

Perciò, l'aumento della coerenza fronto-parietale da noi trovato potrebbe rappresentare l'interazione della corteccia associativa posteriore, dove le informazioni sono immagazzinate, e la corteccia frontale, dove le attuali informazioni rilevanti vengono trattenute e continuamente aggiornate.

Un aumento della coerenza fronto-parietale nei nostri pazienti indicherebbe una maggior interazione delle strutture deputate alla percezione cosciente a seguito della stimolazione elettrica transcranica. Dal punto di vista clinico, sebbene non si sia riscontrata una variazione significativa delle scale di valutazione dopo il trattamento, è stata riportata da parte dei caregivers un'aumentata stabilità del contatto del paziente con l'ambiente esterno. C'è da ricordare che, per quanto attendibili, le scale da somministrare al paziente sono delle misure puntuali del quadro clinico del paziente in uno specifico momento. Questo fa sì che spesso la scala non sia un fedele riflesso dello stato effettivo del soggetto esaminato. L'attenta e costante osservazione dei familiari o degli operatori è sicuramente un parametro più indicativo, seppur soggettivo, del cambiamento del paziente dopo stimolazione con tDCS.

CONCLUSIONI

I dati precedentemente citati nell'introduzione hanno dimostrato che i pazienti in stato vegetativo possono conservare un certo livello di elaborazione cognitiva corticale. I risultati da noi ottenuti in questo progetto di studio replicano ed estendono tali conclusioni.

Dopo aver osservato che l'onda P300 ha un elevato valore prognostico nel recupero di coscienza (Cavinato e coll., 2009), l'utilizzo di paradigmi di complessità crescente, ha permesso di enfatizzare come, anche nei pazienti cognitivamente più compromessi, fosse possibile evocare risposte corticali complesse. Per la corretta interpretazione di tali risultati dovrebbe innanzitutto essere preso in considerazione il fatto che i pazienti non furono divisi in base alla loro attività EEG di background. Kotchoubey e coll. (2005) osservarono come i pazienti in SV con attività elettroencefalografica in banda teta o alfa lento potessero presentare un'onda P300 o altri potenziali cognitivi rispetto a pazienti il cui quadro elettroencefalografico era maggiormente alterato. Ancora, l'alta frequenza di risposte corticali in pazienti in SV riscontrata in questo studio può essere concepito come indicazione di eventuali errori diagnostici (in linea con Andrews e coll., 1996) o come prova che isolati circuiti talamo-corticali possano essere attivati, indicando una funzione risparmiata di alcuni moduli specializzati di elaborazione, anche se questi non sono correlati all'esperienza cosciente. Da evidenze neurofisiologiche e di neuroimaging (Kampf e coll., 1998), risulta che le lesioni tipicamente associate allo stato vegetativo sono assonali diffuse o del corpo calloso e coinvolgono solo parzialmente la materia grigia. Ciò lascerebbe dedurre che, nei pazienti con alterato stato di coscienza, alcuni circuiti corticali

possano operare come isole funzionali, separate dai network in cui sono normalmente integrate in condizioni di normalità. Tuttavia, questa ipotesi “modulare” dovrebbe specificare quale livello di attività corticale dovrebbe essere sufficiente per assumere la presenza di attività cognitiva. Dai dati ottenuti nell’esperimento 1, è stato osservato come anche processi semantici possano avvenire in mancanza di percezione conscia. Tuttavia l’elaborazione semantica appare, in qualche maniera, frutto di un processo quasi automatico e non integrato come invece traspare nei pazienti in stato di minima coscienza e nei soggetti sani.

L’ipotesi dell’elaborazione “gerarchica” non è supportata dai dati da noi ottenuti. L’assunto che l’elaborazione di stimoli semplici sarebbe più semplice di quella relativa a stimoli fisici complessi, non è stata confermata. Toni musicali complessi o toni dal significato saliente sono in grado di evocare componenti ERP (MMN, P300) più frequentemente e di maggior ampiezza rispetto a semplici toni sinusoidali. Un altro assunto dell’elaborazione “gerarchica” dello stimolo è che operazioni di elaborazione semplice siano prerequisiti necessari per operazioni più complesse. I nostri dati sembrano essere compatibili con questa ipotesi. Come regola, le risposte dei pazienti a paradigmi di stimolo più semplici erano più frequenti rispetto alle risposte a paradigmi più complessi. Tuttavia, questa “regola” è stata spesso violata dai nostri pazienti. Queste eccezioni possono essere spiegate attraverso le numerose fluttuazioni dell’*arousal* dei pazienti.

Indipendentemente dall’interpretazione dei risultati, i dati ottenuti dimostrano chiaramente la necessità di utilizzare una batteria di test funzionali a vari livelli di complessità in ogni paziente con gravi lesioni cerebrali. Non è sufficiente ottenere un esito negativo, ad esempio da un paradigma di stimolo

con due toni puri, e dichiarare che un paziente non risponde corticalmente, poiché potrebbe comunque dimostrare risposte significative dopo stimoli più complessi.

Il set di paradigmi di stimolo utilizzato nel nostro esperimento può essere considerato come un primo esempio di batteria di stimolazione nei pazienti in SV.

Negli esperimenti 2 e 3 abbiamo utilizzato diverse tecniche di stimolazione sensoriale e transcranica per misurare la connettività corticale nei pazienti in stato vegetativo e di minima coscienza. Lo scopo era di sviluppare un nuovo approccio per individuare i primi segni e favorire il recupero della coscienza in pazienti non comunicanti.

Questo approccio non si basa sulla capacità di un soggetto di elaborare stimoli sensoriali, per capire ed seguire le istruzioni o comunicare, bensì ha lo scopo di valutare direttamente la capacità dei moduli talamocorticali di interagire tra loro, una condizione considerata critica per il recupero della coscienza (Tononi e Koch, 2008; Laureys, 2005). Tale approccio può essere importante perché la capacità di pazienti cerebrolesi di interagire con l'ambiente esterno può essere ostacolata da lesioni delle corteccie sensoriali / motorie, da difficoltà di comprensione del linguaggio e può fluttuare significativamente nel corso del tempo (Monti et al., 2010).

Per esplorare la capacità dei moduli talamo corticali di interagire, abbiamo stimolato un sottoinsieme di neuroni corticali (dapprima nella corteccia motoria primaria e, successivamente, nella corteccia dorso laterale prefrontale) con rTMS ed analizzato quantitativamente i tracciati EEG per rilevare la cascata di effetti innescati nel cervello dalla perturbazione della stimolazione. Studi recenti hanno dimostrato che con l'impiego rTMS/EEG è possibile rilevare schemi di connettività efficaci. D'altra parte, poiché la rTMS tende ad attivare un grande

insieme di assoni corticali in un modo che è difficile da controllare completamente, questa tecnica è più probabile fornisca una grossolana piuttosto che una fine stima della connettività. Tuttavia, molti studi suggeriscono che la coscienza non dipende tanto da alcuni circuiti specifici, ma piuttosto dalla capacità di regioni distribuite nel cervello di interagire attraverso connessioni cortico-corticali e cortico-talamo-corticali.

L'impiego della stimolazione transcranica elettrica e magnetica potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per promuovere il recupero di coscienza in pazienti non responsivi. Queste metodiche relativamente giovani potrebbero essere specificatamente utili nei pazienti in stato di minima coscienza fornendo un biomarcatore oggettivo del loro grado di elaborazione cognitiva fondamentale per monitorare e guidare il loro trattamento riabilitativo.

Questo nostro studio è stato una piccola goccia in un vasto mare, ma con l'unione di forze orientate verso lo stesso obiettivo, molta strada ancora si riuscirà a percorrere verso la piena comprensione della coscienza e delle sue alterazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Adams JH, Graham DI, Jennett B. The neuropathology of the vegetative state after an acute brain insult. *Brain*. 2000;123:1327-38.
- Alkire MT. A unitary physiologic theory for the mechanism of anesthetic-induced loss of consciousness. In: toward a science of consciousness. Thorverton: Imprint Academic; 2000
- Andrews K, Murphy L, Munday R, Littlewood C. Misdiagnosis of the vegetative state: retrospective study in a rehabilitation unit. *BMJ* 1996; 313: 13-16.
- Azila Noh N, Fuggetta G. Human cortical theta reactivity to high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *Hum Brain Mapp* 2012; 33:2224-2237.
- Babiloni C, Sarà M, Vecchio F, e coll. Cortical sources of resting-state alpha rhythms are abnormal in persistent vegetative state patients. *Clin Neurophysiol* 2009;120:719-729.
- Başar E, Schürmann M, Sakowitz O. The selectively distributed theta system: functions. *Int J Psychophysiol*. 2001;39:197-212.
- Baumer, T, Lange R, Liepert J, Weiller C, Siebner HR, Rothwell JC, et al. Repeated premotor rTMS leads to cumulative plastic changes of motor cortex excitability in humans. *Neuroimage* 2003;20:550–60.
- Bekinschtein TA, Shalom DE, Forcato C, Herrera M, Coleman MR, Manes FF, Sigman M. Classical conditioning in the vegetative and minimally conscious state. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1343-9
- Beninger RJ, Kendall SB, Vanderwolf CH. The ability of rats to discriminate their own behaviour. *Can J Psychol* 1974; 28:79–91.

- Berardelli A, Inghilleri M, Rothwell JC, e coll. Facilitation of muscle-evoked responses after repetitive cortical stimulation in man. *Exp Brain Res* 1998; 22:79-84.
- Berger H. Uber das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch Psychiat* 1929; 87:527–70.
- Bernat JL, Rottenberg DA. Conscious awareness in PVC and MCS. The borderlands of neurology. *Neurology* 2007; 68:885-886.
- Boly M, Faymonville ME, Peigneux P, Lambermont B, Damas F, Luxen A, Lamy M, Moonen G, Maquet P, Laureys S. Cerebral processing of auditory and noxious stimuli in severely brain injured patients: differences between VS and MCS. *Neuropsychol Rehabil.* 2005;15:283-9.
- Boly M, Faymonville ME, Peigneux P, Lambermont B, Damas P, Del Fiore G, Degueldre C, Franck G, Luxen A, Lamy M, Moonen G , Maquet P, Laureys S. Auditory processing in severely brain injured patients: differences between the minimally conscious state and the persistent vegetative state. *Arch Neurol.* 2004;61:233-8.
- Bostanov V, Kotchoubey B. Recognition of affective prosody: continuous wavelet measures of event-related brain potentials to emotional exclamations. *Psychophysiol* 2004;41:259–68.
- Brasil-Neto JP, Cohen LG, Pascual-Leone A, Jabir FK, Wall RT, Hallett M. Rapid reversible modulation of human motor outputs after transient deafferentation of the forearm: a study with transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 1992;42:1302-06.
- Brazier MAB. A history of the electrical activity of the brain: the first half-century. London; Pitman: 1961

- Bremer F. Cerveau 'isole' et physiologie du sommeil. C R Seanc Soc Biol 1929; 102:1235–41. Brignani D, Manganotti P, Rossini PM, e coll. Modulation of cortical oscillatory activity during transcranial magnetic stimulation. Hum Brain Mapp 2008;29:603-612.
- Buchsbaum MS, Gillin JC, Wu J, Hazlett E, Sicotte N, Dupont RM, et al. Regional cerebral glucose metabolic rate in human sleep assessed by positron emission tomography. Life Sci, 1989; 45: 1349–56.
- Cavinato M, Freo U, Ori C, Zorzi M, Tonin P, Piccione F, Merico A. Post-acute P300 predicts recovery of consciousness from traumatic vegetative state. Brain Inj. 2009;23:973-80.
- Chalmers DJ. The conscious mind. Oxford: Oxford University Press; 1996.
- Chen R, Classen J, Gerloff C, e coll. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. Neurology 1997;48:1398-1403.
- Childs NL, Mercer WN, Childs HW. Accuracy of diagnosis of persistent vegetative state. Neurology 1993; 43: 1465–7.
- Coleman MR, Rodd JM, Davis MH, Johnsrude IS, Menon DK, Pickard JD, Owen AM. Do vegetative patients retain aspects of language comprehension? Evidence from fMRI. Brain 2007;130:2494-507.
- Commissione tecnico-scientifica (istituita con D.M. 12 Settembre 2005). Stato vegetativo e stato di minima coscienza. Documento Finale. Roma 14 Dicembre 2005;
- Connolly JF, D'Arcy RCN. Innovations in neuropsychological assessment using event-related brain potentials. Int J Psychophysiol 2000; 37: 31-47.
- Consensus Conference Modena 2000. Modalità di trattamento riabilitativo del traumatizzato cranio-encefalico in fase acuta, criteri di trasferibilità in strutture

- riabilitative e indicazioni a percorsi appropriati. *Giornale Italiano di Medicina Riabilitativa* 2001; Vol 15 N°1: 29-39;
- Cooper JB, Jane JA, Alves WM, Cooper EB. Right median nerve electrical stimulation to hasten awakening from coma. *Brain Inj* 1999;13:261-7.
- Corbetta, M., Shulman, G.L. Control of goal-directed and stimulus driven attention in the brain. *Nat. Rev. Neurosci* 2005. 3,201–215.
- Daltrozzo J, Wioland N, Mutschler V, Kotchoubey B. Predicting coma and other low responsive patients outcome using event-related brain potentials: a meta-analysis. *Clin Neurophysiol* 2007; 118(3): 606-14.
- Davey MP, Victor JD, Schiff ND. Power spectra and coherence in the EEG of a vegetative patient with severe asymmetric brain damage. *Clin Neurophysiol.* 2000;111:1949-54.
- Delorme, A., Makeig, S. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *J Neurosci Methods* 2004;134, 9-21.
- Desmedt, JE. Clinical uses of evoked potentials. *Clin Neurol.* 1984;12(24):1198-210.
- Donchin E, Karis D, Bashore TR, Coles MGH and Gratton G. Cognitive psychophysiology and human information processing. In MGH Coles, E Donchin and SW Porges (Eds), *Psychophysiology: Systems, Processes, and Applications*, Guilford, New York, 1986, 244-67.
- Donchin E, and Coles MGH. Is the P3 component a manifestation of cognitive updating? *Behav Brain Sci* 1988; 11, 357–427.
- Engel AK, Fries P, Roelfsema PR, Konig P, Singer W. Temporal binding, binocular rivalry, and consciousness. *Conscious Cogn.* 1999;8:128-51.

- Faran S, Vatine JJ, Lazary A, Ohry A, Birbaumer N, Kotchoubey B. Late recovery from permanent traumatic vegetative state heralded by event-related potentials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Aug;77(8):998-1000
- Fernández-Espejo D, Junqué C, Vendrell P, Bernabeu M, Roig T, Bargalló N, Mercader JM. Cerebral response to speech in vegetative and minimally conscious states after traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2008;22(11):882-90.
- Ferrarelli F, Massimini M, Sarasso S, e coll. Breakdown in cortical effective connectivity during midazolam-induced loss of consciousness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:2681-6.
- Fischer C, Luauté J, Adeleine P, Morlet D. Predictive value of sensory and cognitive evoked potentials for awakening from coma. *Neurology* 2004; 63(4): 669-73.
- Fischer C, Luauté J. Evoked potentials for the prediction of vegetative state in the acute stage of coma. *Neuropsychol Rehabil*. 2005; 15(3-4): 372-80.
- Fischer C, Luaute J, Morlet D. Event-related potentials (MMN and novelty P3) in permanent vegetative or minimally conscious states. *Clin Neurophysiol*. 2010;121(7):1032-42
- Fischer C, Dailler F, Morlet D. Novelty P3 elicited by the subject's own name in comatose patients. *Clin Neurophysiol*. 2008; 119(10): 2224-30.
- Fiset P, Paus T, Daloz T, Plourde G, Meuret P, Bonhomme V, et al. Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study. *J Neurosci* 1999; 19: 5506–13.
- Fried I, MacDonald KA, Wilson CL. Single neuron activity in human hippocampus and amygdala during recognition of faces and objects. *Neuron* 1997; 18(5): 753-65.

- Fonseca LC, Tedrus GM, Prandi LR, Andrade AC. Quantitative electroencephalography power and coherence measurements in the diagnosis of mild and moderate Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69:297-303.
- Formaggio E, Storti SF, Bertoldo A, e coll. Integrating EEG and fMRI in epilepsy. *Neuroimage* 2011;54:2719-2713.
- Fox P, Ingham R, George MS, Mayberg H, Ingham J, Roby J, Martin C, Jerabek P. Imaging human intra-cerebral connectivity by PET during TMS. *Neuroreport.* 1997 18;8:2787-91.
- Fuggetta G, Pavone EF, Fiaschi A, e coll. Acute modulation of cortical oscillatory activities during short trains of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex: a combined EEG and TMS study. *Hum Brain Mapp* 2008; 29:1-13.
- Fuggetta G, Fiaschi A, Manganotti P. Modulation of cortical oscillatory activities induced by varying single-pulse transcranial magnetic stimulation intensity over the left primary motor area: a combined EEG and TMS study. *Neuroimage* 2005;27:896-908.
- Gallop GG Jr. Chimpanzees: self-recognition. *Science* 1970; 167: 86–7.
- Gawryluk JR, D'Arcy RC, Connolly JF, Weaver DF. Improving the clinical assessment of consciousness with advances in electrophysiological and neuroimaging techniques. *BMC Neurol.* 2010; 10: 11.
- Giacino J, and Whyte J. The vegetative state and minimally conscious state: current knowledge and remaining questions. *J. Head Trauma Rehabil* 2005; 20:30-35

- Giacino JT, Kalmar K, Whyte J. The JFK Coma Recovery Scale-Revised: measurement characteristics and diagnostic utility. *Arch Phys Med Rehabil* 2004; 85:2020-2029.
- Giacino JT, Ashwal S, Childs N, Cranford R, Jennett B, Katz DI, Kelly JP, Rosenberg JH, Whyte J, Zafonte RD, and Zasler ND. The minimally conscious state: Definition and diagnostic criteria. *Neurology* 2002; 58: 349-53.
- Glannon W. Neurostimulation and the minimally conscious state. *Bioethics* 2008; 22(6):337-45.
- Glass I, Sazbon L, Groswasser Z. Mapping "cognitive" event-related potentials in prolonged postcoma unawareness state. *Clin Electroencephalogr.* 1998; 29(1): 19-30.
- Greenfield S. How might the brain generate consciousness? In: Rose S, editor. *From brains to consciousness*. London: Allen Lane; 1998. p.210–27.
- Griskova I, Ruksenas O, Dapsys K, Herpertz S, Höppner J. The effects of 10 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on resting EEG power spectrum in healthy subjects. *Neurosci Lett.* 2007 29;419:162-7.
- Guérit JM, Verougstraete D, de Tourchaninoff M, Debatisse D, Witdoeck C. ERPs obtained with the auditory oddball paradigm in coma and altered states of consciousness: clinical relationships, prognostic value, and origin of components. *Clin Neurophysiol.* 1999;110(7):1260-9.
- Guse B, Falkai P, Wobrock TJ Cognitive effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation: a systematic review. *J Neural Transm.* 2010;117:105-22.
- Hallett M. EEG coherence: an introduction. *J Clin Neurophysiol.* 1999;16:499-500.
- Hebb DO. *The organization of behavior*. New York: John Wiley; 1949

- Heiss W-D, Pawlik G, Herholz K, Wagner R, Wienhard K. Regional cerebral glucose metabolism in man during wakefulness, sleep, and dreaming. *Brain Res* 1985; 327:362–6. Humphrey N. Nature's psychologists. *New Scientist* 1978; 78:900–3.
- Holeckova I, Fischer C, Giard MH, Delpuech C, Morlet D. Brain responses to a subject's own name uttered by a familiar voice. *Brain Res* 2006; 1082(1): 142-52.
- Howard RS, Holmes PA, Siddiqui A, Treacher D, Tsiropoulos I, Koutroumanidis M. Hypoxic-ischaemic brain injury: imaging and neurophysiology abnormalities related to outcome. *QJM*. 2012;105:551-61
- Hurley SL. *Consciousness in action*. Cambridge (MA): Harvard University Press; 1998.
- James W. *The principles of psychology*. New York: Henry Holt; 1890.
- Jasper HH, Descarries L, Castelucci VF, Rossignol S, editors. *Consciousness at the frontiers of neuroscience*. Philadelphia: Lipincott-Raven, 1998. p. 75–94.
- Johnson R Jr. On the neural generators of the P300 component of the event-related potential. *Psychophysiology* 1993; 30(1): 90-7.
- Jones BE. The neural basis of consciousness across the sleep-waking cycle. In: Jasper HH, Descarries L, Castelucci VF, Rossignol S, editors. *Consciousness: at the frontiers of neuroscience*. *Advances in neurology*, Vol. 77. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 75–94.
- Kampfl A, Franz G, Aichner F, Pflauser B, Haring H-P, Felber S, Luz G, Schocke M, Schmutzhard E. The persistent vegetative state after closed head injury: clinical and magnetic resonance imaging findings in 42 patients. *J Neurosurg* 1998;88:809–16.

- Keck ME, Sillaber I, Ebner K, Welt T, Toschi N, Kaehler ST, Singewald N, Philippu A, Elbel GK, Wotjak CT, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M. Acute transcranial magnetic stimulation of frontal brain regions selectively modulates the release of vasopressin, biogenic amines and amino acids in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 2000;12:3713-20.
- Kilduff TS, Kushida CA. Circadian regulation of sleep. In: Chokroverty S, editor. *Sleep disorders medicine.* 2nd ed. Boston: Butterworth Heinemann; 1999. p. 135–47.
- Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;29:169-95.
- Kobylarz EJ and Schiff ND. Neurophysiological correlates of persistent vegetative and minimally conscious states. *Neuropsychol Rehab* 2005;15: 323-332.
- Kotchoubey B. Event-related potential measures of consciousness: two equations with three unknowns. *Prog Brain Res.* 2005;150:427-44
- Kotchoubey B, Lang S, Mezger G, Schmalohr D, Schneck M, Semmler A, Bostanov V, Birbaumer N. Information processing in severe disorders of consciousness: vegetative state and minimally conscious state. *Clin Neurophysiol* 2005; 116(10): 2441-53.
- Kotchoubey B, Lang S, Bostanov V, Birbaumer N. Is there a mind? Psychophysiology of unconscious patients. *News Physiol Sci* 2002; 17: 38-42.
- Kotchoubey B, Lang S, Baales R, Herb E, Maurer P; Mezger G, Schmalohr D, Bostanov V, Birbaumer N. Brain potentials in human patients with extremely severe diffuse brain damage. *Neurosci Lett* 2001; 301: 37-40.

- Kutas M, Dale A. Electrical and magnetic readings of mental functions. In: Rugg MD, editor. *Cognitive neuroscience*. Hove (UK): Psychology Press; 1997. p. 197–242.
- Lang S, Kotchoubey B. Brain responses to number sequences with and without active task requirement. *Clin Neurophysiol* 2002;113:1734–41.
- Lapitskaya N, Coleman MR, Nielsen JF, e coll. Disorders of consciousness: further pathophysiological insights using motor cortex transcranial magnetic stimulation. *Prog Brain Res* 2009; 177:191-200.
- Laureys S. The neural correlate of (un)awareness: lessons from the vegetative state. *Trends Cogn Sci* 2005; 9:556-569.
- Laureys S, Owen AM, and Schiff ND. Brain function in coma, vegetative state, and related disorders. *Lancet Neurol* 2004;3:537-46.
- Laureys S, Perrin F, Faymonville M-E, Schnakers C, Boly M, Bartsch V, Majerus S, Moonen G, and Maquet P. Cerebral processing in the minimally conscious state. *Neurology* 2004;63:916-8.
- Laureys S, Perrin F, Schnakers C, Boly M, Majerus S. Residual cognitive function in comatose, vegetative and minimally conscious states. *Curr Opin Neuro*. 2005; 18: 726-33.
- Laureys S, Faymonville ME, Peigneux P, e coll. Cortical processing of noxious somatosensory stimuli in the persistent vegetative state. *Neuroimage* 2002; 17:732-41.
- Laureys S, Faymonville ME, Degueldre C, Fiore GD, Damas P, Lambermont B, Janssens N, Aerts J, Franck G, Luxen A, Moonen G, Lamy M, Maquet P. Auditory processing in the vegetative state. *Brain* 2000;123:1589-601.

- Leon-Carrion J, Martin-Rodriguez JF, Damas-Lopez J, Barroso y Martin JM, Dominguez-Morales MR. Brain function in the minimally conscious state: a quantitative neurophysiological study. *Clin Neurophysiol.* 2008;119:1506-14.
- Llinas R, Ribary U. Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2078–81.
- Lombardi F, Taricco M, De Tanti A, Telaro E, Liberati A. Sensory stimulation of brain-injured individuals in coma or vegetative state: results of a Cochrane systematic review. *Clin Rehabil.*2002;16:464-72.
- Louise-Bender Pape T, Rosenow J, Lewis G, e coll. Repetitive transcranial magnetic stimulation-associated neurobehavioral gains during coma recovery. *Brain Stimul* 2009; 2:22-35.
- Macquet P, Degueldre C, Delfiore G, Aerts J, Peters JM, Luxen A, et al. Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J Neurosci* 1997; 17: 2807–12.
- Maguire MJ, Brier MR, Moore PS, Ferree TC, Ray D, Mostofsky S, Hart J Jr, Kraut MA. The influence of perceptual and semantic categorization on inhibitory processing as measured by the N2-P3 response. *Brain Cogn* 2009; 71(3): 196-203.
- Mancuso M. Commissione epidemiologica C.N.A.T.C. Presidente Associazione A.Tra.C.To. Toscana. Il trauma cranio encefalico: epidemiologia, esiti, percorso riabilitativo (2009).
- Manganotti P, Formaggio E, Storti SF, e coll. Time-frequency analysis of short-lasting modulation of EEG induced by intracortical and transcallosal paired TMS over motor areas. *J Neurophysiol* 2012; 107:2475-2484.

- Manshanden I, De Munck JC, Simon NR, Lopes da Silva FH. Source localization of MEG sleep spindles and the relation to sources of alpha band rhythms. *Clin Neurophysiol.* 2002;113:1937-47.
- Markowitsch HJ, Kessler J. Massive impairment in executive functions with partial preservation of other cognitive functions: the case of a young patient with severe degeneration of the prefrontal cortex. *Exp Brain Res* 2000;133:94-102.
- Marrocco RT, Witte EA, Davidson MC. Arousal systems. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 166–70.
- Massimini M, Ferrarelli F, Murphy M, e coll. Cortical reactivity and effective connectivity during REM sleep in humans. *Cogn Neurosci* 2010;1:176-183.
- Massimini M, Boly M, Casali A, e coll. A perturbational approach for evaluating the brain's capacity for consciousness. *Prog Brain Res* 2009; 177:201-214.
- Massimini M., Ferrarelli F, Huber R, e coll. Breakdown of cortical effective connectivity during sleep. *Science* 2005; 309: 2228-32.
- Mataro M, Jurado MA, Garcia-Sanchez C, e coll. Long-term effects of bilateral frontal brain lesion: 60 years after injury with an iron bar. *Arch Neurol* 2001;58:1139-1142.
- McCarley RW. Sleep neurophysiology: basic mechanisms underlying control of wakefulness and sleep. In: Chokroverty S, editor. *Sleep disorders medicine*. Boston: Butterworth Heinemann; 1999. p. 21–50.
- McKay DR, Ridding MC, Thompson PD, Miles TS. Induction of persistent changes in the organization of the human motor cortex. *Exp Brain Res* 2002;143:342–349.
- Metzinger T, editor. *Conscious experience*. Schoningh: Imprint Academic; 1995.

- Ministero della Salute. Direzione Generale della Programmazione Sanitaria dei Livelli Essenziali di Assistenza e dei Principi Etici di Sistema. Sintesi documento stato vegetativo e stato di minima coscienza; 15 ottobre 2008
- Moriya T, Takahashi S, Ikeda M, Suzuki-Yamashita K, Asai M, Kadotani H, Okamura H, Yoshioka T, Shibata S. N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2C is not involved in circadian oscillation or photoic entrainment of the biological clock in mice. *J Neurosci Res.* 2000 15;61:663-73
- Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and the activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1949;1: 455–73.
- Müller HM, Kutas M. What's in a name? Electrophysiological differences between spoken nouns, proper names and one's own name. *Neuroreport.* 1996; 8(1): 221-5.
- Multi-Society Task Force on PSV Medical Aspects of the Persistent Vegetative State—Second of Two Parts. *New England Journal of Medicine* 1994;333:1572-1579.
- Munzlani R, Andrade J, Sapsford DJ, Baddeley A, Jones JG. A measure of consciousness and memory during isoflurane administration: the coherent frequency. *Br J Anaesth* 1993; 71: 633–41.
- Muthuswamy J, Thakor NV. Spectral analysis methods for neurological signals. *J Neurosci Methods* 1998 31;83:1-14.
- Näätänen R. The role of attention in auditory information processing as revealed by event-related potentials and other brain measured of cognitive function. *Behav Brain Sci* 1990; 13: 201-88.
- Nagel T. What is it like to be a bat? In: Nagel T. *Mortal questions.* Cambridge: Cambridge University Press; 1979. p. 165–80

- Nikouline V, Ruohonen J, Ilmoniemi RJ. The role of the coil click in TMS assessed with simultaneous EEG. *Clin Neurophysiol* 1999;110:1325-1328
- Ofek E, Pratt H. Neurophysiological correlates of subjective significance. *Clin Neurophysiol* 2005; 116: 2354-62.
- Okamura H, Jing H, Takigawa M. EEG modification induced by repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol*. 2001;18:318-25.
- Pallis C, Harley DH. ABC of brainstem death. 2nd ed. London: BMJ Publishing Group; 1996.
- Pascual-Leone A, Tormos JM, Keenan J, Tarazona F, Cañete C, Catalá MD. Study and modulation of human cortical excitability with transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol*. 1998;15:333-43.
- Paulus,W. Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Suppl. Clin. Neurophysiol*. 2004 57, 708–714
- Penrose R. *Shadows of the mind*. Oxford: Oxford University Press; 1994.
- Perrin F, Schnakers C, Schabus M, Degueldre C, Goldman S, Brédart S, Faymonville ME, Lamy M, Moonen G, Luxen A, Maquet P, Laureys S. Brain Response to One's Own Name in Vegetative State, Minimally Conscious State, and Locked-in Syndrome. *Arch Neurol* 2006; 63: 562-9.
- Perrin F, García-Larrea L, Mauguière F, Bastuji H. A differential brain response to the subject's own name persists during sleep. *Clin Neurophysiol*. 1999 Dec;110(12):2153-64.
- Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clin Neurophysiol*. 1999;110:1842-57
- Piccione F, Cavinato M, Manganotti P, e coll. Behavioral and neurophysiological effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on the minimally conscious state: a case study. *Neurorehabil Neural Repair* 2011;25:98-102.

- Picton TW. The P300 wave of the human event-related potential. *J Clin Neurophysiol* 1992; 9(4): 456-79.
- Plewnia C, Rilk AJ, Soekadar SR, e coll. Enhancement of long-range EEG coherence by synchronous bifocal transcranial magnetic stimulation. *The European Journal of Neuroscience* 2008; 27:1577-1583.
- Plum F. Coma and related global disturbances of the human conscious state. In: Peters A, Jones EG, editors. *Cerebral cortex*. New York: Plenum Press; 1991. p. 359–425
- Plum F, Posner JB. *The diagnosis of stupor and coma*. 3rd ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1982.
- Polanía R, Paulus W, Nitsche MA. Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Hum Brain Mapp*. 2012;33:2499-508
- Polich J. Updating P3: An integrative theory of P3a and P3b. *Clin Neurophysiol* 2007; 118: 2128-48.
- Polich J. Task difficulty, probability, and inter-stimulus interval as determinants of P300 from auditory stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1987; 68(4): 311-20.
- Praamstra P, Kleine BU, Schnitzler A. Magnetic stimulation of the dorsal premotor cortex modulates the Simon effect. *Neuroreport* 1999;10:3671-3674.
- Rappaport M, Hall KM, Hopkins K, Belleza T, Cope DN. Disability rating scale for severe head trauma: coma to community. *Arch Phys Med Rehabil* 1982; 63(3): 118-23.
- Ridding MC, and Rothwell JC. Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:559-567.

- Robbins TW, Everitt BJ. Arousal systems and attention. In: Gazzaniga MS, editor. *The cognitive neurosciences*. Cambridge (MA): MIT Press; 1995. p. 703–20.
- Roizenblatt S, Fregni F, Gimenez R, Wetzel T, Rigonatti SP, Tufik S, Boggio PS, Valle AC. Site-specific effects of transcranial direct current stimulation on sleep and pain in fibromyalgia: a randomized, sham-controlled study. *Pain Pract*. 2007;7:297-306
- Rose S, editor. *From brains to consciousness?* Princeton (NJ): Princeton University Press; 1998
- Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, and the Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clinical Neurophysiol* 2009;120:2008-39.
- Rossini PM, Barker AT, Berardelli A, e coll. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994;91:79-92
- Schiff ND. Recovery of consciousness after brain injury: a mesocircuit hypothesis. *Trends Neurosci* 2010;33:1-9.
- Schiff ND, Giacino JT, Kalmar K, e coll. Behavioural improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury. *Nature* 2007;448(7153):600-603.
- Schiff ND, Rodriguez-Moreno D, Kamal A, e coll. fMRI reveals large-scale network activation in minimally conscious patients. *Neurology* 2005; 64:514-523.

- Schiff ND, Ribary U, Moreno DR, Beattie B, Kronberg E, Blasberg R, Giacino J, McCagg C, Fins JJ, Llinás R, Plum F. Residual cerebral activity and behavioural fragments can remain in the persistently vegetative brain. *Brain* 2002; 125: 1210-34.
- Schiff ND, Plum F. The role of arousal and "gating" systems in the neurology of impaired consciousness. *J Clin Neurophysiol.* 2000;17:438-52.
- Schnakers C, Perrin F, Schabus M, Majerus S, Ledoux D, Damas P, Boly M, Vanhaudenhuyse A, Bruno MA, Moonen G, Laureys S. Voluntary brain processing in disorders of consciousness. *Neurology.* 2008; 71(20): 1614-20.
- Schoenle PW, Witzke W. How vegetative is the vegetative state? Preserved semantic processing in SV patients--evidence from N 400 event-related potentials. *NeuroRehabilitation.* 2004; 19(4): 329-34.
- Sharova EV, Mel'nikov AV, Novikova MR, Kulikov MA, Grechenko TN, Shekhter ED, Zaslavskii AY. Changes in spontaneous brain bioelectrical activity during transcranial electrical and electromagnetic stimulation. *Neurosci Behav Physiol* 2007;37:451-7
- Shallice T. Information-processing models of consciousness. In: Marcel AJ, Bisiach E, editors. *Consciousness in contemporary science.* Oxford: Clarendon Press; 1988. p. 305–33.
- Shaw JC. The EEG, brain function, and Thomson's sampling theory. *Biol Psychol.* 1978;6:139-45.
- Schürmann M, Başar E. Topography of alpha and theta oscillatory responses upon auditory and visual stimuli in humans. *Biol Cybern.* 1994;72:161-74.
- Srinivasan N. Cognitive neuroscience of creativity: EEG based approaches. *Methods.* 2007;42:109-16.

- Steriade M. Neurophysiologic mechanisms of non-rapid eye movement (resting) sleep. In: Chokroverty S, editor. Sleep disorders medicine. 2nd ed. Boston: Butterworth Heinemann; 1999.
- Storti SF, Formaggio E, Franchini E, e coll. A multimodal imaging approach to the evaluation of post-traumatic epilepsy. *Magn Reson Mater Phy* 2012; 25:345-360.
- Strafella AP, Paus T, Fraraccio M, Dagher A. Striatal dopamine release induced by repetitive transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain* 2003; 126:2609-2615.
- Tamura Y, Hoshiyama M, Nakata H, Hiroe N, Inui K, Kaneoke Y, Inoue K, Kakigi R. Functional relationship between human rolandic oscillations and motor cortical excitability: an MEG study. *Eur J Neurosci*. 2005;21:2555-62.
- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *Lancet* 1974; 2: 81–4.
- Tiitinen H, Virtanen J, Ilmoniemi RJ, e coll. Separation of contamination caused by coil clicks from responses elicited by transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol* 1999;110:982-985.
- Tononi G, Koch C. The neural correlates of consciousness: an update. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1124: 239–61
- Tononi G, Edelman GM. Consciousness and the integration of information in the brain. In: Jasper HH, Descarries L, Castelucci VF, Rossignol S, editors. *Consciousness: at the frontiers of neuroscience. Advances in neurology*, Vol. 77. Philadelphia: Lippincott-Raven 1998:245–80
- Valero-Cabré A & Pascual-Leone. A Impact of TMS on the primary motor cortex and associated spinal systems. *IEEE Eng Med Biol* 2005.24:29–36.

- van der Hiele K, Vein AA, Reijntjes RH, Westendorp RG, Bollen EL, van Buchem MA, van Dijk JG, Middelkoop HA. EEG correlates in the spectrum of cognitive decline. *Clin Neurophysiol.* 2007;118:1931-9.
- Van Der Werf YD, Paus T. The neural response to transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. I. Intracortical and cortico-cortical contributions. *Exp Brain Res.* 2006;175:231-45.
- Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1969;26:407-18.
- Vanhaudenhuyse A, Laureys S, Perrin F. Cognitive event-related potentials in comatose and post-comatose states. *Neurocritical Care* 2008;8:262-270.
- Velmans M. Understanding consciousness. London: Routledge; 2000.
- Verlicchi A, Zanotti B. Coma e stato vegetativo: ricerca dei metodi di risveglio. Unità operativa di neurochirurgia, azienda ospedaliera s. maria dellamisericordia, Udine, 2000
- von Stein A, Sarnthein J. Different frequencies for different scales of cortical integration: from local gamma to long range alpha/theta synchronization. *Int J Psychophysiol.* 2000;38:301-13.
- Wassermann EM. Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998; 108:1-16.
- Weiskrantz L. Consciousness lost and found. Oxford: Oxford University Press; 1997.
- Wijnen VJ, van Boxtel GJ, Eilander HJ, de Gelder B. Mismatch negativity predicts recovery from the vegetative state. *Clin Neurophysiol.* 2007; 118(3): 597-605.

Wu T, Sommer M, Tergau F, Paulus W. Lasting influence of repetitive transcranial magnetic stimulation on intracortical excitability in human subjects
Neurosci. Lett 2000; 287:37–40.

Yamaguchi S, Knight RT. Gating of somatosensory input by human prefrontal cortex. Brain Res. 1990 25;521:281-8.

Zeman A. Consciousness. Brain 2001; 124(7): 1263-89.

Zeman A. Persistent vegetative state. Lancet 1997; 350: 795–9.

ALLEGATO 1

Scala di valutazione DRS (Disability Rating Scale)

Patient Name: _____ Date of Rating: _____

Name of Person Completing Form: _____

DISABILITY RATING SCALE:

Disability Rating Scale ratings to be completed within 72 hours after Rehab. Admission. And within 72 hours before Rehab. Discharge.

A. EYE OPENING:

- (0) Spontaneous
- (1) To Speech
- (2) To Pain
- (3) None

0-SPONTANEOUS: eyes open with sleep/wake rhythms indicating active arousal mechanisms, does not assume awareness.
1-TO SPEECH AND/OR SENSORY STIMULATION: a response to any verbal approach, whether spoken or shouted, not necessarily the command to open the eyes. Also, response to touch, mild pressure.
2-TO PAIN: tested by a painful stimulus.
3-NONE: no eye opening even to painful stimulation.

B. COMMUNICATION ABILITY:

- (0) Oriented
- (1) Confused
- (2) Inappropriate
- (3) Incomprehensible
- (4) None

0-ORIENTED: implies awareness of self and the environment. Patient able to tell you a) who he is; b) where he is; c) why he is there; d) year; e) season; f) month; g) day; h) time of day.
1-CONFUSED: attention can be held and patient responds to questions but responses are delayed and/or indicate varying degrees of disorientation and confusion.
2-INAPPROPRIATE: intelligible articulation but speech is used only in an exclamatory or random way (such as shouting and swearing); no sustained communication exchange is possible.
3-INCOMPREHENSIBLE: moaning, groaning or sounds without recognizable words, no consistent communication signs.
4-NONE: no sounds or communications signs from patient.

C. MOTOR RESPONSE:

- (0) Obeying
- (1) Localizing
- (2) Withdrawing
- (3) Flexing
- (4) Extending
- (5) None

0-OBEYING: obeying command to move finger on best side. If no response or not suitable try another command such as "move lips," "blink eyes," etc. Do not include grasp or other reflex responses.
1-LOCALIZING: a painful stimulus at more than one site causes limb to move (even slightly) in an attempt to remove it. It is a deliberate motor act to move away from or remove the source of noxious stimulation. If there is doubt as to whether withdrawal or localization has occurred after 3 or 4 painful stimulations, rate as localization.
2-WITHDRAWING: any generalized movement away from a noxious stimulus that is more than a simple reflex response
3-FLEXING: painful stimulation results in either flexion at the elbow, rapid withdrawal with abduction of the shoulder or a slow withdrawal with adduction of the shoulder. If there is confusion between flexing and withdrawing, then use pinprick on hands.
4-EXTENDING: painful stimulation results in extension of the limb.
5-NONE: no response can be elicited. Usually associated with hypotonia. Exclude spinal transection as an explanation of lack of response; be satisfied that an adequate stimulus has been applied.

D. FEEDING (COGNITIVE ABILITY ONLY)

- (0.0) Complete
- (1.0) Partial
- (2.0) Minimal
- (3.0) None

Does the patient show awareness of how and when to perform this activity? Ignore motor disabilities that interfere with carrying out this function. (This is rated under Level of Functioning described below.)
0-COMPLETE: continuously shows awareness that he knows how to feed and can convey unambiguous information that he knows when this activity should occur.
1-PARTIAL: Intermittently shows awareness that he knows how to feed and/or can intermittently convey reasonably clearly information that he knows when the activity should occur.
2-MINIMAL: shows questionable or infrequent awareness that he knows in a primitive way how to feed and/or shows infrequently by certain signs, sounds, or activities that he is vaguely aware when the activity should occur.
3-NONE: shows virtually no awareness at any time that he knows how to feed and cannot convey information by signs, sounds, or activity that he knows when the activity should occur.

E. TOILETING (COGNITIVE ABILITY ONLY)

- (0.0) Complete
- (1.0) Partial
- (2.0) Minimal
- (3.0) None

Does the patient show awareness of how and when to perform this activity? Ignore motor disabilities that interfere with carrying out this function. (This is rated under Level of Functioning described below.) Rate best response for toileting based on bowel and bladder behavior
0-COMPLETE: continuously shows awareness that he knows how to toilet and can convey unambiguous information that he knows when this activity should occur.
1-PARTIAL: Intermittently shows awareness that he knows how to toilet and/or can intermittently convey reasonably clearly information that he knows when the activity should occur.
2-MINIMAL: shows questionable or infrequent awareness that he knows in a primitive way how to toilet and/or shows infrequently by certain signs, sounds, or activities that he is vaguely aware when the activity should occur.
3-NONE: shows virtually no awareness at any time that he knows how to toilet and cannot convey information by signs, sounds, or activity that he knows when the activity should occur.

F. GROOMING (COGNITIVE ABILITY ONLY)

- (0.0) Complete
- (1.0) Partial
- (2.0) Minimal
- (3.0) None

Does the patient show awareness of how and when to perform this activity? Ignore motor disabilities that interfere with carrying out this function. (This is rated under Level of Functioning described below.) Grooming refers to bathing, washing, brushing of teeth, shaving, combing or brushing of hair and dressing.

0-COMPLETE: continuously shows awareness that he knows how to groom self and can convey unambiguous information that he knows when this activity should occur.

1-PARTIAL: intermittently shows awareness that he knows how to groom self and/or can intermittently convey reasonably clearly information that he knows when the activity should occur.

2-MINIMAL: shows questionable or infrequent awareness that he knows in a primitive way how to groom self and/or shows infrequently by certain signs, sounds, or activities that he is vaguely aware when the activity should occur.

3-NONE: shows virtually no awareness at any time that he knows how to groom self and cannot convey information by signs, sounds, or activity that he knows when the activity should occur.

G. LEVEL OF FUNCTIONING (PHYSICAL, MENTAL, EMOTIONAL OR SOCIAL FUNCTION))

- (0.0) Completely Independent
- (1.0) Independent in special environment
- (2.0) Mildly Dependent-Limited assistance (non-resid - helper)
- (3.0) Moderately Dependent-moderate assist (person in home)
- (4.0) markedly Dependent-assist all major activities, all times
- (5.0) Totally Dependent-24 hour nursing care.

0-COMPLETELY INDEPENDENT: able to live as he wishes, requiring no restriction due to physical, mental, emotional or social problems.

1-INDEPENDENT IN SPECIAL ENVIRONMENT: capable of functioning independently when needed requirements are met (mechanical aids)

2-MILDLY DEPENDENT: able to care for most of own needs but requires limited assistance due to physical, cognitive and/or emotional problems (e.g., needs non-resident helper).

3-MODERATELY DEPENDENT: able to care for self partially but needs another person at all times. (person in home)

4-MARKEDLY DEPENDENT: needs help with all major activities and the assistance of another person at all times.

5-TOTALLY DEPENDENT: not able to assist in own care and requires 24-hour nursing care.

H. "EMPLOYABILITY"(AS A FULL TIME WORKER, HOMEMAKER, OR STUDENT)

- (0.0) Not Restricted
- (1.0) Selected jobs, competitive
- (2.0) Sheltered workshop, Non-competitive
- (3.0) Not Employable

0-NOT RESTRICTED: can compete in the open market for a relatively wide range of jobs commensurate with existing skills; or can initiate, plan execute and assume responsibilities associated with homemaking; or can understand and carry out most age relevant school assignments.

1-SELECTED JOBS, COMPETITIVE: can compete in a limited job market for a relatively narrow range of jobs because of limitations of the type described above and/or because of some physical limitations; or can initiate, plan, execute and assume many but not all responsibilities associated with homemaking; or can understand and carry out many but not all school assignments.

2-SHELTERED WORKSHOP, NON-COMPETITIVE: cannot compete successfully in a job market because of limitations described above and/or because of moderate or severe physical limitations; or cannot without major assistance initiate, plan, execute and assume responsibilities for homemaking; or cannot understand and carry out even relatively simple school assignments without assistance.

3-NOT EMPLOYABLE: completely unemployable because of extreme psychosocial limitations of the type described above, or completely unable to initiate, plan, execute and assume any responsibilities associated with homemaking; or cannot understand or carry out any school assignments.

The psychosocial adaptability or "employability" item takes into account overall cognitive and physical ability to be an employee, homemaker or student.

This determination should take into account considerations such as the following:

1. Able to understand, remember and follow instructions.
2. Can plan and carry out tasks at least at the level of an office clerk or in simple routine, repetitive industrial situation or can do school assignments.
3. Ability to remain oriented, relevant and appropriate in work and other psychosocial situations.
4. Ability to get to and from work or shopping centers using private or public transportation effectively.
5. Ability to deal with number concepts.
6. Ability to make purchases and handle simple money exchange problems
7. Ability to keep track of time and appointments

ALLEGATO 2

Scala di valutazione JFK CRS-R (JFK Coma Recovery Scale)

JFK COMA RECOVERY SCALE - REVISED ©2004																
Record Form																
<i>This form should only be used in association with the "CRS-R ADMINISTRATION AND SCORING GUIDELINES" which provide instructions for standardized administration of the scale.</i>																
Patient:				Diagnosis:				Etiology:								
Date of Onset:				Date of Admission:												
Date																
Week																
	ADM	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
AUDITORY FUNCTION SCALE																
4 - Consistent Movement to Command *																
3 - Reproducible Movement to Command *																
2 - Localization to Sound																
1 - Auditory Startle																
0 - None																
VISUAL FUNCTION SCALE																
5 - Object Recognition *																
4 - Object Localization: Reaching *																
3 - Visual Pursuit *																
2 - Fixation *																
1 - Visual Startle																
0 - None																
MOTOR FUNCTION SCALE																
6 - Functional Object Use †																
5 - Automatic Motor Response *																
4 - Object Manipulation *																
3 - Localization to Noxious Stimulation *																
2 - Flexion Withdrawal																
1 - Abnormal Posturing																
0 - None/Flaccid																
OROMOTOR/VERBAL FUNCTION SCALE																
3 - Intelligible Verbalization *																
2 - Vocalization/Oral Movement																
1 - Oral Reflexive Movement																
0 - None																
COMMUNICATION SCALE																
2 - Functional: Accurate †																
1 - Non-Functional: Intentional *																
0 - None																
AROUSAL SCALE																
3 - Attention																
2 - Eye Opening w/o Stimulation																
1 - Eye Opening with Stimulation																
0 - Unarousable																
TOTAL SCORE																

ALLEGATO 3

Scala di valutazione JFK CRS-R (JFK Coma Recovery Scale)

Western Neuro Sensory Stimulation Profile (WNSSP)

I. AROUSAL/ATTENTION

1. Arousability: (eye opening/facial or body movement to voice/touch or shaking/raising bed/wet cloth on face)

- 0 = Requires REPEATED presentation of two or more stimuli
- 1 = TWO OR MORE stimuli
- 2 = ONE stimulus
- 3 = SPONTANEOUSLY AWAKE

2. Wakefulness: Longest period without being re-aroused

- 0 = < 10 min
- 1 = 11-20 min
- 2 = > 21 min (or all throughout testing session)

3. Eye Contact:

- 0 = Eyes CLOSED
- 1 = Eyes OPEN but not focused on examiner
- 2 = Eyes FOCUSED on examiner (50% or more)
- N = Physically unable to open eyes (CN III paralysis)

4. Attention to Task: Visual attention or ability to attend to tasks

- 0 = Attends <50% of time
- 1 = Attends >50% of time

II. AUDITORY RESPONSE

LOCALIZATION

5. Voice: Response to introductory remarks: "Hello my name is ..."

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = UNDIFFERENTIATED (does not awaken and than = to all stimuli: posturing, hyperventilation, chewing)
- 2 = DIFFERENTIATED (awakens or ≠ to various stimuli: eye movement/head turn)

6. Sound: Best response to non-verbal sound (music/bell/clicker/tape recorder/sneeze/door slam ...out of visual field)

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = UNDIFFERENTIATED (= to all stimuli: posturing, hyperventilation, blinking, chewing,)
- 2 = DIFFERENTIATED (≠ to various stimuli: eye movement/head turn, movement of part touched or named)

COMPREHENSION (of single-stage auditory commands, repeat once without penalty than use ≠ cues, score only coinciding responses, penalty for perseveration)

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = Incorrect response
- 2 = Cued (prior visual modeling /touching /moving intended body part) delayed (>5 s) response
- 3 = Cued, prompt response
- 4 = Spontaneous, delayed response (response after more than 5 s)
- 5 = Spontaneous, prompt response

7. Shake my hand

8. Open/close mouth (if mouth is usually closed, use "open" for command)

9. Stick out tongue

10. Close/open eyes (if eyes are usually opened, use "closed" for command)

11. Raise eyebrows

12. Move body part (that patient can move spontaneously)

III. EXPRESSIVE COMMUNICATION

13. Vocalization:

- 0 = NO response
- 1 = Best spontaneous, non-meaningful VOCALIZATION (moaning, sighing, crying, other vocal noises)

- 2 = Best spontaneous, INAPPROPRIATE VERBALIZATION or mouthing of words irrelevant to the stimulus or unintelligible)
- 3 = Vocalizes on COMMAND (repetition of sound or word) or mouths words or verbalizes APPROPRIATELY either spontaneously or on command (intelligible, relevant speech)

14. Facial/Gestural expression for communication: (except for yes/no head nods)

- 0 = No response during the entire session (only RANDOM grimaces/reflex or involuntary behaviors)
- 1 = ONE (smiling/frowning/eyebrow/eye widening/pointing/reaching/shoulders/waving/pushing away)
- 2 = Uses > ONE gesture/facial expression with communicative intent

15. Yes/No Response: verbal or nonverbal (finger signals, eye gaze, buzzer system) to 3 verbal or written questions spontaneous responses may be given credit (Are you married?/Do you live in/ Were you born in the year...)

- 0 = NEITHER response observed
- 1 = Either "Yes" OR "No" response observed (does not need to be accurate, only present)
- 2 = BOTH responses observed (does not need to be accurate, only present)

IV. VISUAL RESPONSE

TRACKING (repeat several times)

Horizontal Tracking:

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = Follows (from midline) to left OR right side
- 2 = Follows (from midline) to left AND right side
- 3 = Follows across midline from one side to the other

16. Horizontal mirror

17. Horizontal individual (slowly walk from one side of bed/chair around to opposite side, examiner or other person)

18. Horizontal picture (large, brightly colored familiar personality/greeting card/family picture)

19. Horizontal object (*no-sound producing*, brightly colored puppet/snow globe with moving parts)

20. Horizontal mirror

Vertical tracking:

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = Follows (from midline) up OR down
- 2 = Follows (from midline) up AND down

21. Vertical picture

22. Vertical object

COMPREHENSION: Best response to single-stage written commands, "Read card & do what it says", direction may be repeated once & attention directed to card by pointing without penalty, than use ≠ cues. *Do not read card*

- 0 = NO response < 20 s
- 1 = Incorrect response
- 2 = Cued (prior visual modeling /touching or moving intended body part) delayed (>5 s) response
- 3 = Cued, prompt response
- 4 = Spontaneous, delayed response (response after more than 5 s)
- 5 = Spontaneous, prompt response

23. Open mouth (if mouth is usually closed, use "open" for command)

24. Stick out tongue

25. Close eyes (if eyes are usually opened, use "closed" for command)

26. Raise eyebrows

27. Move body part (that patient can move spontaneously)

V. TACTILE RESPONSE

LOCALIZATION

- 28. Touch:** (non-painful tap on shoulder outside vision/ stimulation of ≠ body parts with brush, rough towel, comb)
 0 = NO response < 20 s
 1 = UNDIFFERENTIATED (= to all stimuli: reflexive posturing, hyperventilation, blinking, chewing,)
 2 = DIFFERENTIATED (≠ to various stimuli: eye movement/head turn, movement of part touched or named)
- 29. Oral Stimulation:** (stimulate external surface upper and lower lips with Q-tip)
 0 = WITHDRAWAL/ABNORMAL reflexes (tonic bite, tongue or jaw thrust, lip retraction or pursing)
 1 = PRIMITIVE REFLEXES (chewing, sucking, phasic bite, rooting)
 2 = TOLERATES stimulation
- OBJECT MANIPULATION** ("This is a -. Show me how you use it")
 0 = No response < 20 s
 1 = Holds/releases object
 2 = Moves object/uses it inappropriately
 3 = Reaches for/pushes away object
 4 = Uses appropriately cued (demonstrate correct use, help initiate by touching/raising arm)
 5 = Uses appropriately spontaneously
 N = Both arms casted or splinted
- 30. Manipulation spoon** (present in field of vision or in hand if unable to take it)
- 31. Manipulation comb** (if score <3 thought related to motor rather than cognitive limitations circle the score)
- 32. Manipulation pencil** (try to elicit understanding of object's use by alternate means such as yes/no questions)
- OLFACTORY RESPONSE** (pleasant and unpleasant: cologne/foods: vinegar, cinnamon, coffee, garlic)
 0 = No response < 20 s
 1 = UNDIFFERENTIATED (= to all stimuli: reflexive posturing, hyperventilation, blinking, chewing,)
 2 = DIFFERENTIATED (≠ to various stimuli: eye movement/head turn, movement of part touched or named)
 N = Not applicable (tracheostomy)

REFERENCE

- Ansell, B. J. and J. E. Keenan (1989). "The Western Neuro Sensory Stimulation Profile: a tool for assessing slow-to-recover head-injured patients." *Arch Phys Med Rehabil* 70(2): 104-8.