

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Potenziali evocati nocicettivi da elettrostimolazione
delle fibre A-delta**

Relatore:

Ch.mo Prof. Lucio Marinelli

Corelatore:

Ch.mo Prof. Massimo Leandri

Candidato:

Corrado Ballestracci

Anno accademico 2020-2021

Indice

1. Introduzione

- i. Concetti generali

- ii. Accenni di anatomia e fisiologia
 - a. Anatomia delle vie del dolore
 - b. Fisiologia delle vie del dolore
- iii. Potenziali evocati sensoriali

- iv. Scopo dello studio

2. Parte sperimentale

- i. Strumenti e metodi
 - a. Precedenti tecniche di stimolazione delle vie del dolore
 - b. Strumenti e metodi per le nostre evidenze
- ii. Risultati e discussione

3. Conclusioni

4. Bibliografia e sitografia

5. Ringraziamenti

Introduzione

i. Concetti Generali e scopo dello studio

La conoscenza di un fenomeno deriva dalla possibilità di isolarlo rispetto a variabili, peraltro spesso numerose, che nell'osservazione del reale con esso interagiscono, modificandolo ed essendone modificate.

In medicina l'isolamento di un fenomeno permette di studiarne l'impatto sulla fisiopatologia di una malattia e così sfruttarlo a scopi diagnostici e terapeutici.

Il dolore è un problema globale di salute pubblica, una delle principali cause di ricorso al medico e, nelle sue forme persistenti e croniche, uno dei maggiori motivi di afflizione del malato. A fronte di notevoli sforzi economici, scientifici, sociali quasi tutta la valutazione del dolore rimane semiquantitativa, benché estesamente convalidata.

A ciò contribuisce l'ancora non approfondita conoscenza dei meccanismi fisiologici e patologici del dolore e dunque l'impossibilità di isolare le alterazioni di singole strutture come causa o concausa d'una qualsivoglia sindrome dolorosa. È pertanto necessario che, ancor prima di pensare a ulteriori metodiche semiquantitative di studio, si lavori sul rafforzare la scienza di base sulla questione.

Innanzitutto, è opportuno distinguere il dolore propriamente detto dalla nocicezione. Il primo è definito come *“An unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage”* (Carr et al. 2020); per il secondo, si riporta che *“Nociception[...]refers to activity that occurs in the nervous system in response to a noxious stimulus”* (*ibid.*). Perciò il primo concetto si riferisce ad un'esperienza largamente soggettiva, frutto dell'elaborazione da parte di complessi circuiti neuronali, mentre il secondo, pur lungi dall'espone un fenomeno banale, suggerisce minore complessità e soggettività e una localizzazione che guarda alla periferia del sistema nervoso.

Questa tesi sceglie di trattare il solo ambito della nocicezione e di farlo partendo dalle basi ancora incerte di questo fenomeno. Il punto di vista è elettrofisiologico, ovvero quello dello studio dell'attività elettrica dei neuroni, in questo caso coinvolti nella trasmissione di stimoli algogeni.

Infatti, rimane ad oggi irrisolto un problema di base: non si è ancora in grado di studiare in modo adeguatamente selettivo le vie nocicettive, dacché non se ne può capire a fondo la fisiologia, né, tantomeno, la patologia.

L'intento è quello di diffondere la conoscenza e possibilmente anche l'uso di una nuova metodica di elettrostimolazione per lo studio selettivo di un certo tipo di fibre nocicettive, le A δ . Si cerca, con ciò, di offrire una soluzione al problema della selettività nello studio nocicettivo e di gettare le basi per una più matura comprensione del fenomeno dolore dal punto di vista fisiologico e, indirettamente, patologico.

Al termine di questo breve primo sottocapitolo di introduzione, il secondo si aprirà con un ripasso dell'anatomia funzionale delle vie sensitive. Questo consisterà di due paragrafi, il primo dei quali impiegherà nel riproporre l'organizzazione anatomica delle vie nervose afferenti, con particolare riguardo a quelle dolorifiche.

Delineate le strutture, nel secondo paragrafo se ne esporrà la funzione, limitandosi alle fibre nocicettive cutanee, ed in particolare alle A δ , approfondendo fino all'aspetto molecolare inerente ai canali ionici ed altre componenti di membrana rilevanti in neurofisiologia.

Nel terzo sottocapitolo si presenterà brevemente l'odierna tecnica di evocazione di potenziali corticali somatosensoriali. L'intento è fornire un modello di base di quello che è il contesto pratico in cui si sono realizzati i test di questa tesi.

A conclusione dell'introduzione, in "Scopo dello studio", si discorrerà brevemente dello studio come nuovo tassello nel complesso mosaico della decifrazione dei potenziali evocati corticali.

Il secondo capitolo tratterà del vero oggetto della tesi, cioè la validazione in soggetti sani del nuovo elettrodo interdigitato IDE 150, di cui si vuole ribadire la selettività nei confronti delle fibre A δ cutanee, ma, soprattutto, dei potenziali precoci da esso evocati, risposte mai registrate prima nello studio del dolore.

Il sottocapitolo "Strumenti e metodi", è pure diviso in due paragrafi. Il primo riassume in più passaggi dedicati, le varie tecniche che si sono susseguite nel tentativo di ottenere la stimolazione e lettura dell'attività neuronale tramite applicazione di energia in varie forme e successiva registrazione. Per ognuna saranno messi in risalto i punti di fragilità e i punti di forza, cosicché sia possibile al lettore confrontare le meno recenti tecniche con la più nuova, oggetto della sperimentazione riportata nella tesi. Delle metodiche più moderne, inoltre, si segnaleranno e discuteranno brevemente le indicazioni e l'uso clinico, laddove ne dispongano.

Nel secondo paragrafo si entra nell'ambito dei test svolti per la tesi e del necessario per realizzarli. È pertanto in questa sede che si tratterà dell'ultimo elettrodo sviluppato tra quanti sono citati nella rassegna del primo paragrafo. Si esporranno, quindi, lo studio e

gli spunti che hanno portato alla sua realizzazione. Da questo si dedurranno le proprietà del dispositivo, soffermandosi particolarmente sulle ragioni della selettività.

Però, l'elettrodo in sé non basta. Servono, infatti, giuste apparecchiature di supporto e modalità di applicazione e stimolazione altrettanto adeguate; per cui anche questo aspetto verrà discusso.

La tecnica descritta sarà poi, nella parte "Risultati", ulteriormente indagata nella sua applicazione *in vivo* su volontari, cui si è avuto modo di partecipare. In questo sottocapitolo si descriverà lo studio dei potenziali corticali dolore-correlati o PREP. Nella discussione, si tratteranno gli elementi ritrovati nel corso delle stimolazioni a confronto con i risultati degli altri studi sull'argomento.

Infine, in "conclusioni", si arriverà a ragionare sulle prospettive future della metodica.

ii. Accenni di anatomia e fisiologia

Per comprendere meglio un sistema quando lo si studia bisognerebbe scomporlo nelle sue singole parti, quindi comprendere come quello funziona in virtù di queste.

Questo in medicina si concretizza nello studio rispettivamente anatomico e fisiologico del corpo umano.

Lungi dall'essere completo, un breve riassunto dell'anatomia e della fisiologia delle vie del dolore è necessario al fine di comprendere le tecniche usate per studiarle.

a. Anatomia delle vie del dolore

Le vie sensitive nell'uomo, senza eccezione per quella dolorifica, seguono una distribuzione suddivisibile in tre grandi distretti da periferico a centrale: di ricezione, di conduzione, di integrazione.

Ripercorrendo l'organizzazione spaziale centralizzata di tutto il sistema nervoso, si nota che il distretto di ricezione nasce dalla superficie del suo organo sensoriale di riferimento per poi radunarsi in sovrastrutture sempre più complesse fino a raggiungere il nevrasso. L'organo recettore in questo caso è quanto mai vasto e corrisponde, di fatto, alla superficie di qualunque cavità corporea, seppur minuscola, come nel caso delle più distali tra le diramazioni bronchiali, o capsula di rivestimento, di milza, fegato, ma anche dei vasi e degli stessi nervi. Di fatto ogni piano di clivaggio è parte di quest'organo sensore, tuttavia, la cute è l'organo più squisitamente dedicato a questo compito ricettivo.

Il distretto di conduzione consta delle singole fibre e sovrastrutture in cui queste si organizzano (fasci assonici, nervi, plessi) e si estende per varia lunghezza dalla superficie ricettiva al nevrasso, suo termine prossimale.

Ad ultimo, le REZs, *root entry zones*, nevrassiali costituiscono il confine tra parte conduttiva e integrativa. L'integrazione consiste, *tout court*, nella sommazione o sottrazione presso strutture centrali di segnali prima distinti. La complessità di questi calcoli neuronali si infittisce e si complica man mano che dal livello caudale si risale a quello rostrale. Ciò è giustificato da un crescente numero di sinapsi a partire dal midollo sino ad arrivare alla corteccia. Questa integrazione non potrà che culminare, quindi, nella più complessa delle strutture, il sistema talamo-corticale, e nella più rifinita delle forme, la percezione dello stimolo, ovvero la coscienza dello stesso.

Ma scendendo nel dettaglio dell'anatomia del dolore, si ripercorre la via algica in funzione dei succitati distretti.

Distretto ricettivo

Come detto l'organo sensoriale è diffusissimo. Per ragione del tema, ci si limita a parlare della superficie più rilevante ai fini della stimolazione selettiva: la cute.

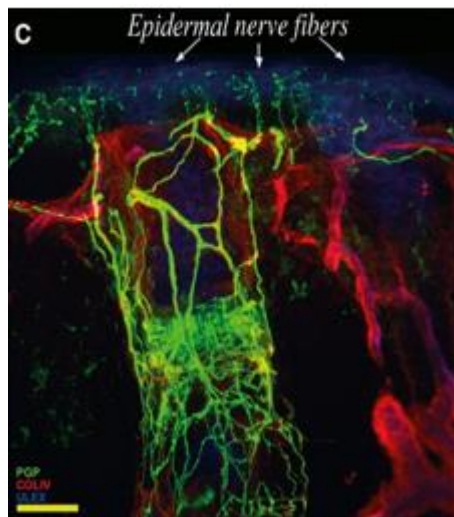


Figura 1. In verde le piccole fibre $A\delta$ e C; in rosso la membrana basale epidermica e in blu le cellule epiteliali di epidermide e annesso pilifero. Si noti che le fibre nervose compenetrano l'epidermide.

L'unità sensoriale ricettiva è detta *recettore* e la forma dei recettori varia in base allo stimolo che sono deputati a rilevare. La forma dei recettori cutanei del dolore è quella di sfiocamenti di fibre che compenetrano il derma e l'epidermide e che, laddove la cute ne sia provvista, avvolgono anche i bulbi piliferi (vedi fig. 1 e 2 da Nolano et al. 2013). Tali fibre sono i terminali di assoni mielinizzati di piccolo calibro ($A\delta$) e non mielinizzati (C) che, perso il rivestimento di cellule di Schwann, si dipanano nude.

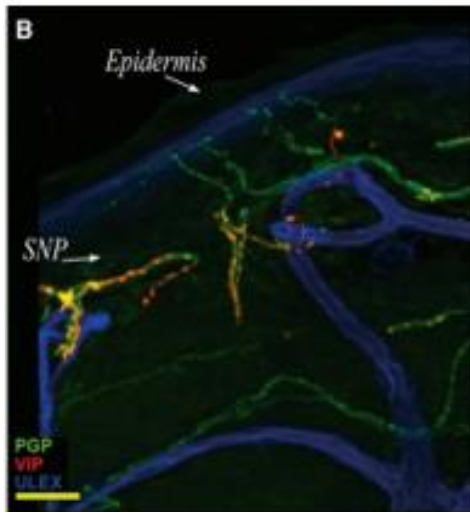


Figura 2. In rosso VIP, un costrasmittitore, in verde sempre le piccole fibre e in blu gli epiteli.

Nelle immagini, una serie di fibre nervose è fatta risaltare con un pigmento fluorescente verde che lega selettivamente CGRP e SP, ovvero marcatori specifici delle fibre dolorifiche. Come bene si vede, le terminazioni A δ e C si diramano liberamente nei vari strati della cute, ma, e questo diviene fondamentale per l'oggetto dello studio, esse sono le uniche fibre che penetrano l'epidermide. Ciò è alla base della scelta di tale epitelio come luogo privilegiato di stimolazione al fine di studiare le vie dolorose. Solo due altre

zone sono innervate soltanto da fibre dolorifiche libere: la cornea e la polpa dentale, ma per ragioni pratiche e di accettabilità da parte dello stimolato, dopo i primi studi, sono state abbandonate.

Distretto Conduttivo

La conduzione del dolore è distribuita in modo anatomicamente identico a quella di ogni altra modalità sensoriale. Gli assoni delle fibre A δ e C, infatti, circondati da endonevrio, si raggruppano in fascicoli tenuti assieme dai setti perinevrionali. I fascicoli formano nervi una volta compattati dalla guaina epinevrionale.

È degno di nota il fatto che un nervo sia composto per il 70% circa da fibre A δ e C ma che queste, oggetto della ricerca della tesi, siano quelle su cui ad oggi meno si conosce in termini neurofisiologici.

Alcuni nervi lungo il loro decorso offrono interessanti e pratiche finestre per la stimolazione e registrazione dei potenziali che li attraversano. Sono tra questi il mediano prima del tunnel carpale o a volte il radiale e il tibiale posteriore alle estremità dell'arto superiore e inferiore rispettivamente, nonché il plesso brachiale nella fossetta sopraclavicolare.

Distretto integrativo

La trasmissione centrale del dolore è certamente la più complessa tra le modalità sensoriali.

Questo inevitabilmente comporta che anche per il nevrasso molte rimangono le lacune in ambito anatomico e fisiologico.

Si può suddividere il nevrasso in tre zone ben distinte sul piano ontogenetico, filogenetico e funzionale: midollo spinale, tronco encefalico e cervello.

Il midollo spinale è la struttura più semplice ed antica; riceve ordinatamente nei suoi neuromeri, attraverso le corna posteriori, i fasci di fibre dolorifiche. Queste ultime, a differenza di quelle di altre modalità, terminano tutte in sinapsi midollari nelle lamine dalla I alla V, le A δ prevalentemente in I, II, V, le C prevalentemente nella II, anche se attraverso vari interneuroni anche le lamine VI, VII e VIII ricevono i loro segnali, evento alla base della diffusione del dolore in campo clinico. Da quelle la gran parte delle proiezioni dolorifiche si raccoglie nei cordoni spinotalamici. Dalla IV in poi convergono anche proiezioni β , possibile giustificazione del dolore riferito.

Dalle lamine I e V-VII si generano il fascio spinotalamico anteriore, antico, che veicola informazioni C, dolorifiche protopatiche e termiche al caldo, e quello laterale, che veicola dolore discriminato e freddo, cioè informazioni δ , oltreché non dolorifiche. I due decussano nella commessura anteriore e si compattano a formare il lemnisco spinale a livello troncoencefalico.

In realtà non è filogeneticamente corretto definire l'anteriore come più antico, essendo che esso non si conserva con regolarità in specie evolutivamente successive ad un certo antenato. Inoltre, il fascio neospinotalamico si dovrebbe suddividere ulteriormente in due fasci: uno dorsolaterale che veicola informazioni dalle lamine I e II davvero discriminative e a destinazione corteccia somatosensoriale primaria e uno ventromediale che proietta dalle lamine più profonde e che veicola già informazioni protopatiche, destinate al talamo mediale, quindi a una proiezione corticale diffusa.

Fasci minori sono lo spinoreticolare, in cui convergono fibre dalla lamina VII, VIII e X, non decussate, per formazione reticolare e talamo; lo spinomesencefalico o spinoparabrachiale, composto da proiezioni delle lamine I, V, VII, X destinate al grigio periacqueduttale e al nucleo parabrachiale, che a sua volta proietterà all'amigdala; infine, il tratto cervicotalamico, appunto solo cervicale, che proietta ai nuclei di Burdach e Goll, ma soprattutto ai nuclei talamici della linea mediana dalle lamine III e IV; infine il fascio spinoipotalamico, da I, V, VIII a vari nuclei ipotalamici

A livello troncoencefalico i riferimenti nucleari sono più diffusi di quanto capiti per le vie cordonali posteriori e per la gran parte appartengono alla sostanza reticolare e al grigio periacqueduttale. Queste sinapsi generano riflessi al dolore di complessità maggiore

rispetto a quelli spinali; inoltre, gli esiti riflessi sono diffusi a un numero ben più grande di distretti corporei.

Unitosi al lemnisco trigeminale nella parte originante dal nucleo più caudale, dedicato a termo e nocicezione, il lemnisco così arricchito accede al cervello per la via talamica.

I nuclei che ricevono le proiezioni sono molti, ma principalmente riducibili a due gruppi: il gruppo laterale (VPL, VPM e VP) e il gruppo mediale (centrale laterale, centromediano e parafascicolare, ecc.). I primi ricevono afferenze discriminative, neospinotalamiche, quindi da lamine superficiali e fibre A δ . I secondi paleospinotalamiche, quindi da lamine profonde e fibre C. Queste ultime raccolgono anche fibre del fascio cervicotalamico e proiezioni parabrachiali per l'amigdala.

In realtà esiste anche un accesso non talamico al cervello consistente nelle proiezioni aminergiche del fascicolo prosencefalico mediale. Indirettamente, infatti, *locus coeruleus*, nuclei del rafe, sostanza nera compatta, ricevendo afferenze dolorose, veicolano per primi lo stimolo dolorifico al cervello, provocando *arousal* corticale.

I nuclei paracentrali proiettano in modo diffuso e anche in questo caso per fini attivatori e di preparazione alla risposta.

VPM e VPL sarebbero destinati alla corteccia somatosensoriale primaria ma questo non è accettato all'unanimità. Infatti, da molti studi è stato oramai escluso un centro specifico per il dolore; si ritiene, invece, che le proiezioni dolorifiche siano parte di un sistema diffuso di percezione (*body self pain neuromatrix*), costituito da talamo, corteccia del cingolo, insula, SI e SII che rielaborano quasi simultaneamente gli input, coordinandosi con strutture sottocorticali.

Le matrici sarebbero molteplici e integrate, permettendo al contempo di ottenere: coscienza dello stimolo, associazione a sensazione spiacevole, integrazione col patrimonio mnesico e simbolico.

Tuttavia, come appare da alcuni studi elettrofisiologici anche recenti con elettrodi corticali in risposta a stimolazione con laser Nd:YAP (Bastuji et al. 2016), ancorché diffusa, questa matrice ha dei riferimenti precisi e ognuno di essi ha un ruolo abbastanza singolare; cioè non è possibile, per il dolore, raggiungere lo stato cosciente semplicemente attivando una corteccia di riferimento, come avviene, per esempio, con gli stimoli tattili epicritici non dolorosi. SI, che pure viene attivata da proiezioni topografiche dolorifiche, non genera né coscienza né percezione dello stimolo doloroso come tale. Solo l'attivazione di concerto con altre regioni comporta una percezione dello stimolo in quanto nocivo.

Dallo studio citato poc'anzi queste aree paiono per latenza di attivazione essere riordinabili in tre gruppi, aventi funzioni diverse:

1. Primo gruppo (inizio dell'attivazione a 110-120 ms dopo lo stimolo): insula e opercolo posteriori, corteccia motoria supplementare e cingolo medio, amigdala.
2. Secondo gruppo (inizio a 130-140 ms): Corteccia prefrontale, parietale posteriore, insula anteriore
3. Terzo gruppo (inizio a 160-180 ms): Ippocampo, corteccia perigenuale e cingolata ventrale posteriore.

Il fatto di ottenere i dati con questa modalità ha permesso di avere, per la prima volta, una visione di insieme con una risoluzione spaziale e temporale non ottenibile con altre metodiche, di fatto non dinamiche, come la fMRI.

b. Fisiologia delle vie del dolore

Distretto ricettivo

Lo stimolo doloroso è energia applicata ad intensità tale da potenzialmente provocare danno all'organismo.

Data l'importanza del sistema, esso si è conservato per una parte consistente nella sua filogenesi (Lynne U. Sneddon 2018).

I recettori sono costituiti da arborizzazioni terminali sulle quali una serie di proteine transmembrana garantisce la sensibilità a stimoli di varia natura: chimica, meccanica, termica.

Che un gradiente di cariche elettriche generi uno stimolo dolorifico, invece, è in natura improbabile. I risultati degli esperimenti in laboratorio, infatti, rappresentano l'effetto di attivazioni artificiali, come quelle ottenute dai neurofisiologi, e aspecifiche, in quanto dipendenti dalla natura eccitabile della cellula nervosa e non già dalla selettività recettoriale della stessa.

Gli altri stimoli, naturali, possono essere rilevati da fibre uni o polimodali. Siccome ogni fibra esprime un solo tipo di proteina-sensore, la polimodalità dipende dalla capacità di queste proteine di generare un potenziale elettrico a livello di membrana a seguito di stimolo in una o più modalità.

Per avere una proporzione: il 70% circa delle fibre periferiche sono dolorifiche, però solo il 12% sono A δ , mentre la gran parte sono C ripartite in un 30% multimodale, un 20% di sensibili a stimoli meccanici e mecano-termici e un 5% silenti (Lynne U. Sneddon 2018).

Le fibre C, inoltre, possono essere distinte in due grandi gruppi: peptidergiche e non peptidergiche. Le prime esprimono Sostanza P, CGRP, *calcitonin-gene-related-protein*, ambedue usati come marcatori istologici specifici per piccole fibre nervose, TrkA, un recettore per NGF, e CB1, recettore 1 per cannabinoidi, specializzate nel trasmettere stimoli termici e chimici lesivi. Le seconde esprimono carboidrati leganti l'isolecitina IB4, PAP, fosfatasi alcalina prostatica, e MrgprD, *MAS-related GPR family member D*, attivatore indiretto del canale TRPA1 nei neuroni nocicettori, orientate verso il dolore meccanico e il prurito (Crawford e Caterina 2020).

Gli stimoli meccanici possono essere trasdotti da terminazioni dedicate (meccanocettori ad alta soglia) o miste alle termiche (meccanocettori a bassa soglia). A tal proposito esistono canali a bassa ed alta soglia, cationici e non specifici, sensibili alla pressione a intensità maggiore rispetto a quanto avviene per le fibre A-beta. Alcuni studi hanno recentemente identificato nei prodotti del gene *PIEZO2* dei possibili candidati a ruolo di trasduttore meccanico nel topo (Murthy et al. 2018).

Generalmente la soglia cutanea al dolore da pressione è 1-5 Bar.

Gli stimoli termici inducono anch'essi un potenziale mediato da canali termo-sensibili, ma lo fanno su fibre diverse. In generale le terminazioni termocettive sono meccano-cettori a bassa soglia per il caldo (C e δ , rispettivamente CMH e AMH) o per il freddo (solo δ , AMC). Gli AMH sono ulteriormente suddivisi in due sottotipi: AMH tipo I con bassa soglia meccanica e sensibilità a stimoli termici persistenti (40-50°C), ma alta per i termici acuti (53°C di media), dedicate a trasmettere il caldo persistente; AMH tipo II, con alta soglia meccanica e bassa soglia al caldo acuto (46°C di media), quindi responsive alla componente termica precoce (Lefaucheur 2019).

I canali che renderebbero sensibili le A δ sarebbero dei TRP, cioè canali cationici polimodali non selettivi in grado di rilevare tossine batteriche ed irritanti ambientali. Sarebbe, infatti, la loro associazione con un'altra corrente di Ca²⁺ entrante, evidentemente selettiva per le alte temperature, a renderli selettivi per queste ultime (Buijs e McNaughton 2020).

Il caldo nocivo, ovvero l'esposizione a temperature superiori a 42-43°C, pare rilevabile grazie a tre tipi di canali, sempre della famiglia dei TRP o *transient receptor potential channels*: TRPV1, M3 e A1 (Vandewauw et al. 2018). Da notare che TRPA1 può trasdurre sia per il freddo (<10°C) che per il caldo nocivo, a dire che non è responsabile tanto della modalità percettiva, quanto della sensazione dolorosa ad essa associata.

Anche TRPV2 si è dimostrato sensibile a temperature molto elevate sulle fibre A δ .

Il freddo, come già accennato, induce stimolo attraverso canali condivisi col caldo (TRPA1), ma anche propri; è il caso di TRPM8, sensibile anche al mentolo. Il fatto che TRPA1 sia espresso in fibre termocettive sensibili sia al caldo che al freddo potrebbe giustificare la sensazione di dolore evocabile con stimoli tiepidi e freschi combinati su griglia Thunberg, uno strumento utilizzato per stimolazioni termiche selettive.

Le fibre dedicate alla trasmissione del freddo sono C e A δ ; mentre le prime trasmettono sensazione di dolore a escursioni sotto i 30°C, le seconde trasmettono sia dolore (a temperature molto basse, <0°C) che sensazione di freddo.

La sensibilità chimica del dolore è soprattutto legata all'infiammazione, ovvero alla tempesta di sostanze che vengono rilasciate da agenti endogeni ed esogeni nel microambiente flogistico.

Principali attori in questo contesto sono le fibre C peptidergiche. A stimolare in questo caso sono vari DAMPs o prodotti di secrezione cellulari; infatti questa presenta canali attivati da protoni (ASIC), recettori per purine (P2X₃), bradichinina (B₂) (Cesare e McNaughton 1997). La fibra stessa, per riflesso assonico antidromico o *axon flare*, rilascia retrogradatamente CGRP e sostanza P che a loro volta trovano recettori sulla fibra stessa e su cellule infiammatorie come i mastociti, che in risposta degranulano. Questi fenomeni creano un meccanismo ad ansa retroattiva positiva che mantiene il dolore ed è alla base dei fenomeni di iperalgesia, allodinia e dolore persistente e cronico. Come detto, inoltre, i canali TRP sono in grado di rilevare stimoli DAMPs, come visto per TRPA1 o come anche può fare TRPV1 con protoni e sostanze irritanti come la capsaicina, di cui una forma V1-like è stata documentata anche sulle fibre A δ .

Le fibre silenziose sono a distribuzione principalmente viscerale e non trasducono segnali in condizione basale, ma si attivano in determinati stati infiammatori. Anche se la loro presenza a livello non viscerale potrebbe essere implicata nella sensibilizzazione centrale e nell'iperalgesia secondaria, dato che non sono attive nella cute sana, la loro trattazione esula dagli intenti di questa esposizione.

Distretto conduttivo

La funzione del nervo sano è semplicemente trofico-conduttiva, cioè deve garantire la preservazione del segnale trasportato conservando un microambiente idoneo alla conduzione. Questo dà ragione della relativa resistenza del nervo a lesioni di varia natura, soprattutto ipossica e mecano-lesiva, il che include una discreta capacità di rigenerazione. D'altronde, mentre il neurone è ben protetto dai suoi astucci ossei

scarsamente flessibili, il nervo deve sopportare sollecitazioni di ogni tipo e attraversare zone dove il flusso sanguigno può venir meno anche solo per questioni di natura funzionale, e.g. la contrazione di un muscolo.

Questa relativa semplicità del nervo offre una finestra neurofisiologica importante per studiare il dolore e non solo, essendo possibile ridurre la complessità dell'attività nervosa a due variabili: velocità e ampiezza di conduzione. La praticità e riproducibilità con cui si possono ottenere informazioni in questo distretto ne ha permesso la conservazione come valido strumento clinico di studio della patologia nervosa anche nell'epoca del neuroimaging, dove altre tecniche, come l'EEG o i PESS hanno perso invece terreno.

Le fibre libere si raccolgono in assoni di vario diametro e dunque vario grado di mielinizzazione come descritto in tabella 1 (Lynne U. Sneddon 2018).

Table 1. Properties of mammalian peripheral fibers

Fiber Type	Myelinated	Diameter, μM	Conduction Speed, m/s	Thermal Sensitivity	Function	Modality
A α	Yes	13–20	80–120	No	Proprioreceptor	Information regarding movement from muscles, joint capsules, etc.
A β	Yes	6–12	35–90	No	Mechanoreceptor	Touch and pressure from skin
A δ	Yes	1–5	5–40	Yes	Nociception	Mechanothermal – cold and heat from skin
				No	Touch	Touch from skin
C	No	0.02–1.5	0.5–2	Yes	Nociception	Polymodal (mechanical, thermal, and chemical) C-mechanoreceptor (CM), C-mechanoheatnociceptor (CMH), C-mechanocoldnociceptor (CMC), C-heatnociceptor (CH) Silent (heat only after sensitization) C-low-threshold fiber (CLT) from skin
				No	Touch	

Properties of mammalian peripheral fibers showing the variety of A and C fibers that can be characterized from fiber diameter, myelination, conduction speed, and function.

Tabella 1. Le varie tipologie di fibre nervose sensoriali e relative caratteristiche. Ai fini del discorso della tesi, si noti che il range di velocità di conduzione delle A β e delle A δ si sovrappongono ad uno degli estremi.

La velocità di conduzione ed il grado di mielinizzazione di una fibra sono direttamente proporzionali al quadrato del suo diametro. Ciò comporta che le fibre A δ veicolino più rapidamente l'impulso e che questo, ragionevolmente, costituisca il cosiddetto *primo dolore*. Le C, più lente, sono quindi responsabili del *secondo dolore*. Il secondo dolore è anche detto *dolore persistente* ed è la prima causa di ricorso del paziente al medico; potrà essere *nocicettivo* o *neuropatico* a seconda che i segnali siano generati a livello di un tessuto danneggiato o in conseguenza ad attività di assoni compromessi. Diverso, invece, è il *dolore cronico* il cui significato protettivo è perduto, divenendo niente più che una patologia a sé stante. Quest'ultimo è frutto di rielaborazioni centrali sul lungo periodo di stimoli periferici, si pensa di natura C, e non è una questione veramente nocicettiva, per cui non se ne farà ulteriore menzione.

La conduzione è saltatoria per le fibre A δ e punto a punto per le C; tuttavia il principale canale del sodio che genera il potenziale d'azione in queste fibre è il medesimo: SCN9A, la cui mancata funzione depriva completamente della capacità di recepire stimoli dolorifici.

Distretto integrativo

L'attività a questo livello è un'amplificazione dei potenziali periferici, poiché una gran mole di neuroni processano l'informazione afferente.

A livello midollare le fibre A δ prendono sinapsi con neuroni delle lamine dalla prima alla quinta. Il neurotrasmettitore utilizzato è il glutammato, ma una serie di cotrasmettitori modulano la risposta. CGRP, SP sono quelli principalmente rilasciati dalle sinapsi. Essi sarebbero responsabili di una stimolazione prolungata e diffusa delle corna posteriori, inducendo una *long-term-potential* per via di secondi messaggeri, accompagnando in questo senso l'attività degli NMDA canalizzati da ripetute stimolazioni glutammatergiche. Questo sarebbe alla base della sensibilizzazione centrale, che pare giochi un ruolo nel già citato dolore cronico.

Il tronco encefalico, lungi dall'essere un semplice centro di *relay* in cui nuovi fasci si generano o aggiungono alle vie spinali, funge già da primordiale centro di integrazione, adeguando le funzioni vitali e la risposta motoria alla risposta dolorifica (cuore, polmoni, tono muscolare sfinteriale e riflessi di retrazione).

Solo nella corteccia cerebrale, però, come detto sopra, si genera coscienza di uno stimolo. I tre gruppi di aree riportate nella descrizione anatomica del distretto integrativo svolgono funzioni differenti, ma integrate e tutte in tempo sufficiente da precedere la prima risposta motoria (a 260 ms):

I: Lo stimolo, dopo essere stato localizzato in SI, viene associato alla qualità dolore (insula) ed al significato affettivo, che s'accompagna a debite risposte viscerali (amigdala), già facilitando una eventuale risposta motoria (SMA e cingolo medio).

II: Solo con l'attivazione della corteccia prefrontale si ha percezione cosciente dello stimolo dolorifico, già corredato di tutte le precedenti caratteristiche descritte al punto I.

III: Lo stimolo diviene parte del vissuto del soggetto come proprio, da sé derivante (corteccia cingolata posteriore) e memorizzato come tale (ippocampo); inoltre sono indotte risposte di soppressione retrograda dello stimolo doloroso (corteccia perigenuale). La soppressione retrograda dello stimolo doloroso operata dalla corteccia perigenuale è in realtà solo l'ultimo di una serie di sistemi soppressivi a *feedback* negativo che s'attivano di fatto già prima che lo stimolo divenga cosciente e che agiscono indipendentemente da esso, col fine di mantenere l'omeostasi delle trasmissioni laddove nessuno stimolo prevalente d'allarme sia generato.

Sul midollo posteriore, lamina II in particolare, convergono numerose proiezioni inibitorie. La via negativa più rapida è il sistema di *gating* di Wall e Melzack. Esso

consiste di collaterali di assoni A β glutammatergici che, distaccate a livello della lamina II, inibirebbero, per mezzo di sinapsi con interneuroni glicinergerici della gelatina di Rolando, le afferenze dolorifiche dello stesso neuromero. Questo principio è alla base della pratica della TENS e dell'agopuntura, ma è ancor oggi dibattuto sotto molti aspetti nel mondo scientifico.

Un sistema più lento è quello discendente troncoencefalico, composto principalmente di due vie aminergiche. Il sistema ceruleo-spinale, che origina dal *locus coeruleus* pontino, noradrenergico, e quello rafespinalo, serotoninergico, che origina dal nucleo pontino del rafe magno e che a sua volta riflette l'attività del grigio periacquoduttale con cui è connesso. Entrambi inibiscono indirettamente le afferenze dolorifiche della lamina II e V sfruttando le proiezioni degli interneuroni gelatinosi, ma la via ceruleo-spinale pare avere effetto anche direttamente.

È opportuno ricordare, inoltre, che il talamo stesso, come universale filtro delle afferenze corticali è di fatto un inibitore del dolore superiore. Questo bene si ritrova nella clinica di chi ne ha perso funzione in seguito a trauma, ictus, infiltrazione ecc. La sindrome di Dejerine-Roussy che ne può risultare è chiaro indice della perdita di quell'equilibrio fisiologico che, evidentemente, il talamo contribuisce a mantenere nel soggetto sano.

Ad ultimo, ma non per importanza, va citato il sistema oppioidergico. Sulle corna posteriori, nel grigio periacquoduttale e nel bulbo ventrale, così come, anche se meno intensamente, in molte altre regioni del SNC si concentrano recettori oppioidergici. Se ne conoscono tre principali: δ , κ , μ .

L'attivazione di questi recettori comporta generalmente inibizione delle vie di trasmissione del dolore. Tuttavia, le terminazioni A δ sono meno densamente stipate di recettori e ciò potrebbe essere alla base della maggiore efficacia dimostrata dai farmaci oppioidi nel contrastare il dolore cronico rispetto a quello acuto. L'inibizione si verifica a mezzo di canali che aumentano il flusso postsinaptico di K⁺ e che, a livello prossimale, riducono il rilascio di neurotrasmettitori.

Questo però è vero soprattutto a livello delle corna posteriori, dove proiezioni endorfiniche, scarse ma presenti, di origine grigiospinale inibiscono direttamente le sinapsi nella lamina II. Nelle sinapsi tra nuclei sovraspinali, invece, come accade tra grigio e nuclei del rafe o tra ipotalamo, che pure possiede neuroni a proiezione encefalinergica, e grigio, il principale effetto è attivatorio. Ciò comporta che l'iniezione sistemica di morfina generi analgesia diretta a livello spinale e attivazione dei sistemi di feedback sovraspinali con conseguente analgesia indiretta.

iii. Potenziali evocati sensoriali

In questo testo si tratterà solo di PREPs (*Pain-related evoked potentials*). Ma prima di parlare di potenziali evocati correlati al dolore è opportuno approfondire il discorso sui potenziali evocati in quanto tali.

In neurofisiologia l'attività nervosa viene registrata come l'oscillazione di un'isoelettrica su di un tracciato continuo. Le deflessioni verso l'alto sono convenzionalmente la traduzione grafica di potenziali negativi e, viceversa, quelle verso il basso rappresentano potenziali positivi. Questa attività può essere rilevata con un elettrodo registrante posto direttamente al di sopra o in stretta prossimità della sorgente di segnale, oppure a distanza, sfruttando l'alta conduttività dei tessuti che formano il volume conduttore-corpo umano. Nel primo caso si otterrà una registrazione *near-field*, nel secondo *far-field*.

Viene intuitivo pensare che una registrazione prossima alla sorgente rilevi segnali di intensità maggiore, ma manchi dell'ampiezza di veduta di cui gode invece la registrazione più remota (Muzyka e Estephan 2019).

Ebbene, i potenziali evocati sono la registrazione *far-field* di potenziali evocati in periferia e *near-field* delle risposte corticali, registrati a livello dello scalpo. Da quanto suddetto si può evincere che l'elettrodo registrante posto sul cuoio capelluto potrà rilevare vari potenziali, espressione dell'attivazione stimolo-indotta di varie sorgenti lungo il corso delle vie nervose dal punto di stimolazione (generalmente il dorso della mano od il polso per l'arto superiore, il dorso del piede o l'area retromalleolare laterale per l'arto inferiore) al punto di registrazione, cioè lo scalpo sovrastante la corteccia somatosensoriale primaria controlaterale, prima area di proiezione telencefalica della via stimolata.

Le risposte allo scalpo vengono visualizzate in un grafico tensione-durata ($\mu\text{V}/\text{ms}$) in cui si succedono in ordine temporale da sinistra a destra le onde d'attivazione dei vari generatori lungo la via stimolata. I potenziali registrati hanno bassa ampiezza, 0,1-10 μV , circa cento volte più piccoli dell'onda R delle bipolari all'ECG e pertanto necessitano di essere messi in evidenza per poterli valutare meglio. A questo fine si utilizza il processo di *averaging*, ovvero di mediazione del segnale. Le varie risposte sono rielaborate come una matrice digitale che, anche successivamente al momento di registrazione, può essere sottratta nei suoi elementi non ripetitivi e sommata in quelli simili. I primi verranno quindi a scemare, i secondi si amplificheranno. Così facendo, il rumore si abbatte e le componenti di rilievo, espressione dell'attivazione sequenziale post-stimolo, risaltano. L'unico problema potrebbe essere una attività muscolare ripetitiva, che verrebbe risaltata

dal processo e che, avendo ampiezza maggiore delle risposte sensitive, potrebbe coprire le onde di interesse. È pertanto necessario cercare in tutti i modi di evitare artefatti muscolari, peraltro non infrequenti, dato che sono correlati anche allo stimolo doloroso o all'arco riflesso da esso innescato.

Siccome le singole risposte sono di ampiezza molto ridotta, è suggerito che si medino almeno 512 risposte per traccia, su una registrazione di almeno 1024 replicazioni, poi, idealmente, da separare in almeno 2 tracce da 512 ciascuna.

L'apparato di registrazione si completa con un amplificatore differenziale e un monitor dove visualizzare i dati ed elaborarli. L'amplificatore differenziale, derivato dall'amplificatore operazionale, può essere configurato anche come filtro per la banda di frequenze in cui registrare o banda passante, generalmente tra 10 e 2000Hz. Il nome *op.amp.* (*operational amplifier*) deriva dal fatto che al tempo dei primi calcolatori veniva utilizzato come unità di computo capace di realizzare semplici operazioni algebriche sui due segnali entranti, uno nell'ingresso negativo o invertente e l'altro in quello positivo o non invertente. Per avere una stima dell'efficienza del dispositivo in questo senso è stato elaborato il concetto di CMRR (*Common Mode Rejection Ratio*), rapporto tra segnale in uscita e quello in ingresso, espresso in dB. Maggiore è la reiezione, maggiore è la capacità dell'amplificatore di eliminare il segnale inutile. Per una buona registrazione si raccomandano CMRR di >90dB.

Infine, è possibile applicare filtri di vario genere in analogico o digitale sulle tracce singole o sull'*average*.

I montaggi raccomandati per queste registrazioni sono (Muzyka e Estephan 2019):

-Per l'arto superiore: EPi-EPc (punto di Erb ipsi e controlaterale a stimolazione), C5S (processo spinoso di C5)-Rif (EPc), CPi-Rif (EPc), CPc-CPi (centroparietale controlaterale ed ipsilaterale).

-Per l'arto inferiore: T12S (processo spinoso di T12)-IC (cresta iliaca; riferimento), Fpz-C5S (riferimento), CPz (a metà tra Cz e Pz)-Fpz, CPi-Fpz

I riferimenti per i PREP sono diversi ed eterogenei, perché diverse sono le metodiche di stimolazione e quindi verranno trattati singolarmente per ogni metodica, dove necessario. Prima di trattare le componenti che vengono registrate nel corso della via nervosa è opportuno soffermarsi sull'apparato stimolante, di fondamentale rilievo in questo contesto.

Così come si possono ottenere risposte diverse variando la posizione dell'elettrodo registrante, pure variando metodo e posizione della stimolazione si ottengono onde differenti.

Nei SEP la stimolazione avviene di norma con elettrodi bipolari a coppetta o autoadesivi a placca, connessi ognuno a ciascun polo del generatore di impulsi (uno negativo e uno positivo), di norma posizionati sulla faccia volare dell'avambraccio (nervo mediano) per l'arto superiore e tra malleolo mediale e tendine d'Achille (nervo tibiale posteriore) per l'arto inferiore. La distanza tra i due elettrodi deve essere di 2-3 cm e l'intensità di corrente erogata deve essere sufficiente a generare contrazione muscolare lieve. La frequenza degli impulsi deve essere sui 5 Hz al polso e sui 2 Hz alla caviglia.

La sensazione percepita dal soggetto è dunque tattile, perché gli elettrodi attivano le fibre sensitive di grande diametro e quelle motorie. Pertanto, quello che si riesce a studiare con questa tecnica è l'integrità della via sensitiva non dolorifica in un tutt'uno, ma non nella singolarità delle sue componenti.

SEP generators, SEP peaks, and their anatomic correlates				
Upper extremity generators	Estimated peaks	Pathway	Estimated peaks	Lower extremity generators
Primary somatosensory cortex: – N20: area 3b in the posterior bank of the Rolandic fissure – P22: motor area 4 – P27: parietal cortex – N30: supplementary motor area	N20/P22 (near field)	Cortex	P37/38 (near field)	Primary somatosensory cortex (analogous to median N20, multiple cortical generators are involved)
VPL nucleus of the thalamus	N18 (far field)	Thalamocortical pathway/VPL nucleus of the thalamus between upper pons and midbrain	N34 (far field)	VPL nucleus of the thalamus (analogous to median N18)
Dorsal column fasciculus cuneatus synapses at nucleus cuneatus in lower medulla (postsynaptic)	P13/14 (far field)	Medial lemniscus decussation (cervicomedullary junction)	N30/P31 (far field)	Dorsal column tract synapses at nucleus gracilis (cervical fasciculus gracilis and possibly gracile nucleus in caudal medulla, analogous to median P14)
Cervical cord: – P/N11: cervical dorsal roots into dorsal horns entry zone – N12/P12: dorsal column level – N13/P13: dorsal column fasciculus cuneatus	N13 (far field)	Dorsal column of the spinal cord	N22 (LP) (far field)	Lumbar cord: lumbosacral dorsal roots into dorsal horns of lumbar cord into dorsal column fasciculus gracilis
Erb point (brachial plexus afferent volley) Median/ulnar nerve	N9 (EP) (far field) N5	Peripheral potential Peripheral mixed nerve	P18 (far field) N8(PF)	Sacral plexus, analogous to median P9 Popliteal fossa (tibial peripheral nerve) Posterior tibial/peroneal nerve →

Tabella 2. Vari potenziali lungo le vie somatosensoriali di arto superiore ed inferiore durante PESS. Come evidenza di attività Aβ si riprenderà in seguito la N20.

L'utilità della tecnica è pertanto limitata a danni grossolani fondamentalmente della via centrale lemniscale, essendo lo studio del periferico principalmente materia dell'ENG, e non essendo in grado di rilevare alterazioni che interessino solo singole tipologie di fibre. In particolare, non è possibile valutare la funzione delle fibre Aδ e C, a soglia più alta delle Aβ.

Ad ogni modo le singole componenti con relativi generatori, per l'arto superiore e per quello inferiore, si riportano nella tabella 2 (Muzyka e Estephan 2019).

iv. Scopo dello studio

L'attuale uso clinico dei SEP è fondamentalmente riconducibile a quattro contesti: rilevazione di danno centrale se l'anamnesi e l'esame neurologico sono equivoci, senza possibilità di usare altri esami o con esito dubbio di questi; slatentizzazione di danni al sistema sensitivo altrimenti silenti, come capita a volte nella sclerosi multipla; mappatura di lesioni pregresse per capire la distribuzione del danno patologico; monitorare lo stato del SNC/P in soggetti non collaboranti.

Un ampio spazio essi trovano però anche in ambito di ricerca. Il loro ruolo in quest'ambito è stato negli ultimi anni significativamente rivisto dall'avvento di nuove tecniche di imaging avanzato come la trattografia RM o la *fMRI*. Tuttavia, si può essere certi che gli studi elettrofisiologici non verranno soppiantati *in toto* almeno fin quando continueranno a godere di un vantaggio indiscusso: la risoluzione temporale. Anche se abbastanza grossolana nel risolvere le singole unità funzionali (2 cm² per l'EEG rispetto ai micrometri che può raggiungere una TC a raggi gamma o una RM a 5-7 B) e benché esistano anche modalità di registrazione profonda ben più accurate degli elettrodi allo scalpo, la registrazione elettrografica acquisisce *frames* di attività elettrica in tempo praticamente reale, considerando che può rilevare variazioni di potenziale che avvengono nell'ordine di qualche decina di μ s. Velocità irraggiungibile dalle altre metodiche, che acquisiscono con finestre di secondi o pochi minuti. Allo stato attuale si può dire che valga una rielaborazione concettuale del teorema di Eisenberg per cui si è obbligati a scegliere se cogliere l'evento come statico nella sua unicità o la dinamicità dell'evento, perdendo l'elemento singolo in moto.

Le due possibilità, per cui, ancora si integrano e nessuna predomina nettamente sull'altra. Detto questo, non si può negare che sarebbe utile una tecnica capace di coprire efficacemente entrambi gli aspetti, e spaziale e temporale. I SEP, così come oggi sono ottenuti, sono grandemente non selettivi, sia a livello periferico che centrale. Il nervo è attivato in tutte le sue componenti, che a livello del SNC integrano i loro segnali generando sottrazione o sommazione.

La possibilità di stimolare selettivamente un certo tipo di fibra costituisce di certo un passo avanti nell'aumentare quella risoluzione spaziale che sopra si diceva la neuroradiologia vantasse sulla neurofisiologia.

Di fatto lo scopo di questi studi è proprio quello che si riportava all'inizio dell'introduzione: conoscere un'incognita permette di risolvere un'equazione che prima ne aveva due. Se fosse possibile stimolare selettivamente una componente sensoriale di

un nervo, il fatto di trovare questa normale o alterata permetterebbe di capirne direttamente o indirettamente la causa e quindi associare una specifica cura. Inoltre, anche solo da un punto di vista di ricerca, la capacità di separare dal contesto misto delle risposte centrali da stimolazione aspecifica una componente singola e le sue vie aiuta a risolvere un singolo elemento prima fuso, comprenderne la funzione dunque poterne giudicare un'eventuale disfunzione.

Se Virgilio scriveva *e parvis magna*, il tentativo di risolvere meglio le singole unità generatrici del SNC richiede adeguati strumenti atti a realizzare un processo opposto, *e magnis parva*.

Parte sperimentale

i. Strumenti e Metodi

a. Precedenti tecniche di stimolazione delle vie del dolore

Se il fine è conseguire selettività e in questo caso selettività per le fibre $A\delta$, ci sono tre modi con cui questo si potrebbe ottenere: rendere selettiva la registrazione a livello centrale, registrare una selettiva risposta motoria riflessa o rendere selettiva la stimolazione. La prima opzione non è percorribile per un problema ontologico: è il cosiddetto *inverse problem*. L'*inverse problem* riguarda la possibilità di risalire con tecniche elettrofisiologiche alla sorgente di un determinato potenziale applicando la tecnologia in maniera opposta a quanto nella clinica normalmente si fa. Questo a dire che mentre nella quotidiana pratica elettrofisiologica ci si pone la domanda “che potenziali generano note sorgenti?” (*forward problem*), nell’ambito della ricerca sarebbe spesso più utile trovare risposta alla domanda “che sorgenti generano potenziali noti?” (*Inverse problem*). L'*inverse problem* non è del tutto dipanabile con la tecnologia odierna per questioni di distorsione che i segnali subiscono sommandosi o sottraendosi tra loro nella moltitudine di sinapsi centrali e per questioni di risoluzione del segnale, che non raggiunge la qualità necessaria per mettere a fuoco le singole, minute sorgenti.

Per quanto riguarda la seconda possibilità, si è provato a registrare risposte riflesse specifiche nocicettive a seguito di stimolazioni aspecifiche come il riflesso di triplice retrazione dell’arto inferiore (R3) o superiore valutato con EMG. Non risulta, tuttavia, pratico da solo, poiché lo stimolo per evocarlo è aspecifico; inoltre, comporta discomfort per il paziente, meccanico, ma anche percettivo, considerando che la stimolazione deve essere di una certa intensità per evocare simili riflessi. Peraltro, si tratta di un metodo indiretto di rilevazione dello stimolo.

Anche il tentativo di utilizzarlo come segno di buona trasmissione dolorifica si è rivelato deludente, considerando che la mancanza del riflesso non chiarisce se il problema sia motorio o sensitivo e la sua conservazione non esclude danni modesti alle vie di trasmissione superiore.

Si è quindi optato per la terza via, una stimolazione selettiva delle fibre dolorifiche. Con la certezza, infatti, che a essere stimulate siano le sole fibre algiche, il segnale generato percorrerebbe solo le vie deputate, che ne verrebbero messe direttamente in luce.

I metodi tentati per stimolare selettivamente in periferia sono in essenza tre (Garcia-Larrea 2006): si può erogare uno stimolo ad alta intensità così da essere certi di attivare le fibre dolorifiche e analizzare le onde generate con specifiche metodiche, anche se di fatto questa rimane una modalità aspecifica di stimolazione; si può modificare la qualità dello stimolo affinché evochi potenziali solo in certe fibre; oppure si può fornire uno stimolo aspecifico, banalmente applicare un potenziale elettrico, in un territorio dove sono presenti solo fibre dolorifiche che possano venirne eccitate.

High intensity transcutaneous electrical stimulation

Sfrutta il principio per cui una intensa stimolazione transcutanea tronculare, benché distale, dovrebbe attivare con certezza le fibre A δ e C oltre le A β . La risposta corticale dolorifica sarebbe derivata da un processo *in silico* off line di sottrazione del segnale tra risposte a intensità solo tattile, minore, e risposte tattili-dolorifiche, maggiore, per ottenere una risposta solo dolorifica. Questa risposta indiretta detta *negative differential potential* (NDP), a 75-240 ms dallo stimolo, sarebbe quindi il surrogato dell'attività delle aree dedicate al dolore, ma soltanto “*if one assumes a simple additive model*” (Dowman e Schell 1999).

È questa, si può dire, un'assunzione un poco ingenua dato che, come già notava la scuola della *Gestalt* prima dell'avvento dell'EEG, quando si ha a che fare con un sistema altamente complesso come il SNC umano, nulla funziona a compartimenti stagni, ma “il tutto è più che la somma delle singole parti”. È stato infatti dimostrato che già a livello midollare, per *gating* del segnale, l'attività A β modula l'attività dolorifica e così si può immaginare che accada a livello di tronco encefalico e talamo-corteccia, dati i sistemi di controllo del dolore di cui si è parlato nella parte di fisiologia.

Per paradosso si era addirittura riportato che fosse lo stimolo doloroso a inibire lo stimolo somatosensoriale ad alta frequenza ed intensità di stimolazione (Dowman e Schell 1999), quando invece ciò non accadeva con metodi di stimolazione meno aspecifici, tanto che gli autori arrivarono a chiedersi: “*why in our studies painful electrical stimulation inhibits innocuous somatosensation but heat, laser and mechanical pain stimuli do not*”. Fecero risalire il problema a questioni attentive, se non che, poi, nel loro stesso studio dimostrarono che non si poteva parlare di problema attentivo.

Ammesso che la soppressione non fosse un errore tecnico, probabilmente essa era una delle tante prove che le interazioni tra sistema somatosensoriale e dolorifico esistono e rendono impossibile lo studio selettivo delle loro vie quando stimolate assieme.

La HITES è caduta in disuso come metodo di studio delle vie dolorifiche, tuttavia offre un interessante spunto per trattare di una distinzione importante tra le onde sulla base della tempistica.

Le prime onde a presentarsi nelle risposte corticali sono, generalmente nel range dei primi 18-70 ms, diretta conseguenza dell'attivazione sequenziale dei neuroni lungo la via tattile e dolorifica, senza che vi intervengano eventi cognitivi modulatori. Sono indipendenti dalla volontà e attenzione del soggetto, semplice espressione che uno stimolo ha attivato una certa via, totalmente correlate a quest'ultimo nelle sue variazioni. Come ritrovato da Bastuji et al., infatti, non sono ancora state attivate quelle aree dedicate all'elaborazione cosciente del segnale. Le risposte dopo questo tempo, generalmente registrate al vertice, tendono ad essere condizionate dalla rielaborazione cognitiva che il soggetto opera rispetto all'evento stimolazione e perciò sono dette *event-related-potentials*. Il problema di queste risposte, che pure sono utili allo studio della trasmissione nocicettiva, è che variano al variare del comportamento cognitivo del soggetto e non in maniera proporzionale alla sola intensità dello stimolo. Per le risposte dolorifiche questo è particolarmente spiccato e quindi tanto più in questo contesto si rischia di interpretare una variazione di ampiezza corticale come veritiera, quando invece essa dipende dalla aumentata attenzione del soggetto nei confronti dello stimolo. Ciò rende inevitabilmente difficile la standardizzazione, soprattutto in contesti dove l'attenzione diventa un elemento fondamentale rispetto alla patologia in studio, come nella fibromialgia, per esempio.

Applicazione di stimolo selettivo

Come descritto in fisiologia le fibre dolorifiche rilevano tre tipi di stimoli: meccanici, termici, chimici. Il terzo tipo si presta male allo studio, essendo che non è possibile evocare stimoli con frequenza tale da generare delle risposte mediabili in modo significativo; semmai si può ottenere una risposta prolungata nel tempo, peraltro poco localizzabile rispetto alle altre e quindi non facilmente mappabile a livello centrale. Ad ogni modo, un tentativo, ormai storico, è stato fatto per studiare questa modalità sensitiva. Gli altri due sono stati oggetto di varie applicazioni al fine di trovare un metodo pratico ed efficace, applicabile in clinica.

Contact-heat-evoked-potentials

I potenziali evocati da calore a contatto (CHEP) sono il risultato della ricerca di un metodo termico per evocare PREPs. Lo strumento utilizzato per riscaldare la cute è la placca di Peltier.

Il dispositivo ha un'area di contatto di poco più di 5 cm² ed eroga calore alla velocità di 70°C/s. La rapidità dell'ascesa termica è fondamentale per conseguire un'attivazione delle fibre dolorifiche che sia corretta e possa essere ripetuta numerose volte. Generalmente ci si serve di escursioni da 30 a 50°C con 51° quale temperatura ideale, in circa 200-250ms. La stimolazione evoca una sensazione di puntura di spillo, segno di attività A δ , probabilmente reclutando anche fibre C, benché quest'ultima sia un'istanza difficile da dimostrare. Lo stimolo non è cutileensivo a queste finestre di esposizione.

Le risposte corticali evocate sono ben più tardive di quelle evocate con altre metodiche presunte selettive, per ragioni probabilmente correlate con un lento fronte di salita dell'energia trasferita, e si aggirano intorno ai 430 ms e 490 per la N2 dell'arto superiore e inferiore rispettivamente e 570 e 620 per la P2 che segue, con ampiezze sui 15 μ V in montaggio Cz-Au1/2 (Seifert et al. 2008). Per risposte N1 operculo-insulari è possibile montare anche T3-4 o T5-7 contro Fz (Baumgärtner, Greffrath, e Treede 2012). Gli stimoli sono separati da intervalli di 8-12 s al fine di ridurre l'abitudine zonale, comunque non prevenendola del tutto.

Tuttavia, i CHEP hanno limiti importanti: sono scarsamente riproducibili, data l'eterogeneità delle latenze ottenute nei vari studi e sono risposte *event-related*.

Lo stimolo ha durata consistente e di fatto è sempre presente una curva di riscaldamento cui segue, peraltro in un punto incerto, la generazione dello stimolo, facendo così perdere di ampiezza al segnale. Esiste in correlazione a questo la costante possibilità di generare artefatti da stimolo, soprattutto in condizioni non standard come quella clinica.

Lo stimolo penetra ben oltre l'epidermide e questo comporta comunque, probabilmente, attivazione delle A β a livello assonico, oltre al fatto che la placca, come dice il nome stesso, è a contatto con la cute e questo già costituisce uno stimolo tattile.

Infine, l'applicazione di energia con una placca di 5 cm² costituisce un problema di adattabilità della superficie stimolante a regioni corporee disparate.

La possibilità di multiple stimolazioni, il basso costo, l'innocuità, la comodità della placca Peltier nel raggiungere varie aree corporee sono i suoi punti di forza.

Contact-cold-evoked-potentials

I CCEP sono meno diffusi e testati dei CHEP, ma i primi esperimenti con placca a raffreddamento idraulico risalgono già agli anni '70. Più modernamente sistemi di raffreddamento a spray freddo sono riusciti a raggiungere velocità di escursione da ambiente a sottozero in 70 ms.

Le onde corticali, N2/P2, però, variano consistentemente da studio a studio sia in ampiezza (5-30 μ V) che in latenza (da meno 190 ms in MEG e 327ms in EEG per la prima onda).

I sistemi per applicare il freddo sono, in generale, oggi, più inefficienti della Peltier per CHEP, meno pratici e assai variabili nei risultati; sono, pertanto, come detto, anche meno studiati. Ad ultimo, le aree corticali che sembrano rispondere al freddo nocivo appaiono in parte consistente sovrapposte a quelle del freddo innocuo.

L'unico vantaggio evidenziabile è l'applicabilità del freddo in contesti di ipersensibilità al caldo come l'infiammazione e le neuropatie a carattere dolorifico urente (Baumgärtner, Greffrath, e Treede 2012).

Mechanically-evoked-potentials

I mcEPs possono essere evocati perifericamente in due modi: con *pricking*, cioè con un ago tagliente, meglio punta arrotondata e lati affilati, o con un mezzo ad ampia superficie di contatto che eserciti una sufficiente pressione, come una punta smussa di pochi millimetri collegata ad un algometro o un proiettile di gomma di 1,2x0,6 cm ripetutamente spinto da un compressore contro la cute. I primi studi, trent'anni fa, avevano evidenziato risposte a 24-29 ms (onda bifasica N+P) e una seconda componente a 300, che, comparata ad un controllo tattile, pare, ovviamente, l'unica significativa.

La metodica in ogni caso non ha dato grandi risultati in termini di riproducibilità e qualità dei tracciati, considerando la quantità di rumore $A\beta$ sottostante. Si tratta inoltre di metodiche evidentemente abbastanza invasive.

Un'altra metodica di fatto meccanica è quella dei PREP viscerali. In questo caso la stimolazione è ottenuta in visceri accessibili (esofago, retto) via distensione della cavità con un palloncino. A questo tipo di stimolazione generalmente se ne associa una elettrica della mucosa. Nel caso dei potenziali viscerali le onde registrate, anche intuibilmente, meno definite rispetto alle somatosensoriali, cadevano con un primo gruppo (N1/P1) a 60-90 ms e con un secondo (N2/P2) a 170-280. Di fatto qui la stimolazione è anche

selettiva per regione e non solo per stimolo, dato che i recettori viscerali sono solo fibre C. L'uso di questi potenziali, peraltro impervi in clinica, potrebbe ricadere sulla valutazione dell'ipersensibilità viscerale in corso di certe patologie come l'IBS (Baumgärtner, Greffrath, e Treede 2012).

Nasal-mucosa-evoked-potentials

Sono l'unico, ingegnoso esempio di stimolazione chemonocicettiva. A livello della mucosa nasale le terminazioni nervose sono trigeminali per la parte dolorifica, cioè reattiva agli irritanti, e del I nervo cranico, per la parte olfattiva. Per stimolare selettivamente le fibre C trigeminali di questa regione è necessario usare uno stimolo inodore a cui però il trigemino possa rispondere. A questo scopo è stata ideata una cannula capace di somministrare flussi rapidi e polarizzati di gas. L'agente stimolante prescelto è stata la CO₂: inodore, causa calo del pH localizzato nella mucosa e attivazione delle fibre C attraverso i canali TRPV1 e ASIC. Attraverso la cannula è fatta fluire aria ambiente finché l'operatore non la alterna ad un rapido getto di CO₂. Tuttavia, al di là della laboriosità della metodica e del fastidio che può evocare, di fatto questa può applicarsi solo alla valutazione trigeminale (Baumgärtner, Greffrath, e Treede 2012).

Laser-evoked-potentials

I potenziali evocati laser sono oggi il *gold standard* nella esecuzione dei PREP, pertanto meritano una trattazione un poco maggiore. La loro selettività dipende da proprietà ibride tra selettività recettoriale e selettività spaziale. Questo dipende dal fatto che, almeno stando alle ragioni dei suoi fautori, il laser genererebbe uno stimolo termico nocivo, dunque rilevabile solo da fibre termo-sensibili, per cui A δ e C; inoltre sarebbe selettivo perché l'energia applicata alla cute sarebbe in grado di stimolare solo l'epidermide e dunque solo le fibre in essa contenute, appunto le A δ e C, come descritto nella parte sull'anatomia delle vie del dolore.

Il laser ha oggi indicazione allo studio dell'ipoalgesia correlata a danno nervoso, ma anche della disestesia associata a dolore neuropatico.

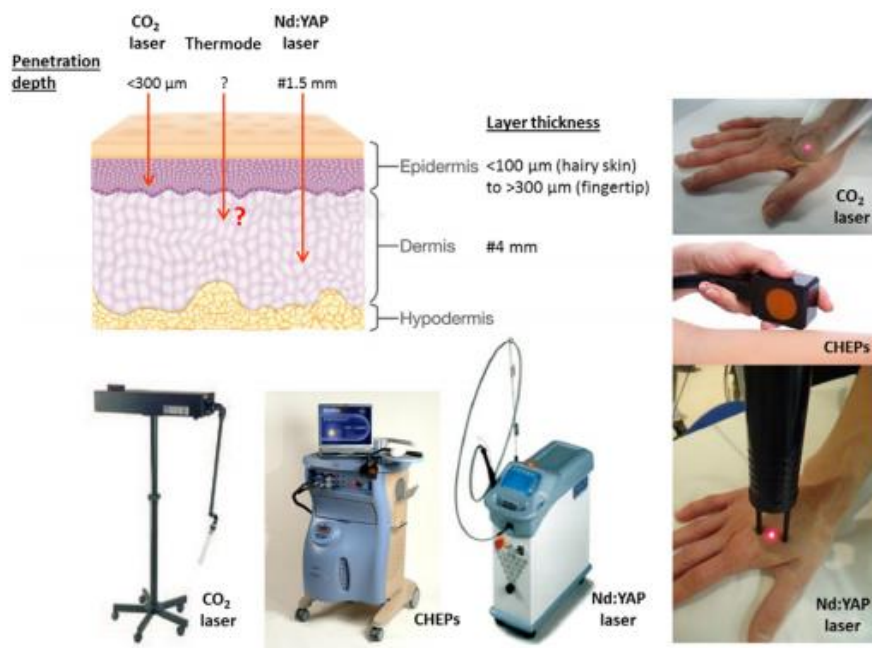


Figura 3. Sono presentate alcune tecniche di stimolazione presunte selettive per stimolo specifico. In basso a sinistra da interno ad esterno: Laser a CO₂, stimolatore per CHEPs e laser Nd:YAP, lo strumento ad oggi più utilizzato in clinica; dall'alto in basso a destra le rispettive interfacce cutanee di stimolazione. In alto a sinistra le profondità raggiunte dai vari dispositivi. Si noti che solo il laser a CO₂ sembra mantenersi confinato all'epidermide.

I dispositivi più usati, riportati in fig. 3 (Lefaucheur 2019), sono il laser a CO₂ (lunghezza d'onda di 10,6 μm), primo ad essere impiegato allo scopo, nel 1975, meno penetrante ma più cutileisivo e il *solid-state-laser* al tulio o neodimio (1-2 μm). Di fatto è l'ultimo, Nd:YAP, il preferito tra i tre, anche perché più maneggevole del laser a CO₂.

La minore lunghezza d'onda permette di penetrare più in profondità nei tessuti, facendo crescere più lentamente la temperatura per il Nd:YAP rispetto al CO₂.

Stimolando a 1,5-2 volte la soglia la sensazione è puntoria, poi urente; questo si attribuisce a una stimolazione iniziale delle Aδ, seguite dalle C.

Il rischio di danno locale da stimolazione prolungata è significativo, per questa ragione e anche per evitare l'abitudine delle fibre, è necessario variare costantemente la posizione del fascio; inoltre, è pericoloso per gli occhi e pertanto sia soggetto che esaminatore sono tenuti a indossare occhiali schermati.

Il montaggio minimo consigliato è di quattro elettrodi (Valeriani et al. 2012): Fz e Cz riferiti a nasion o Au_c per le componenti di vertice, un elettrodo controlaterale temporale per registrare, contro Fz, la N1 e infine un EOG per gli artefatti oculari. La banda passante dovrebbe impostarsi su 0,1-200 Hz.

I potenziali laser-evocati corticali (LEP) sono potenziali evento-relati distinti in due raggruppamenti temporali e non ci sono potenziali precoci, probabilmente coperti dal *jitter* della curva di ascesa del calore.

Un primo gruppo si compone di due componenti, N1 controlaterale a 171 ms e P1 frontale bilaterale, entrambe sui 5-8 μV , pressoché contemporanee, frutto probabile dell'attivazione della corteccia opercolare SII/insula). Un secondo gruppo è un potenziale bifasico al vertice N2/P2, di 10-15 μV , espressione di un potenziale insulo-cingolato anteriore, che dalla mano impiega 236 e 341 ms a manifestarsi con laser CO₂ (Cruccu et al. 2008). Le latenze, comunque, variano abbastanza tra i diversi studi, riportando valori in range da 100 a 160 ms per la N1 e da 200 a 250 e 250-350ms per la N2 e P2 rispettivamente (Lefaucheur 2019).

È interessante notare come le stesse onde ottenute con Nd:YAP siano anticipate di 20 ms in media. Una ragione potrebbe essere che la maggiore profondità raggiunta dal laser potrebbe attivare qualche terminazione A β , perdendo di selettività, anche se alcuni autori fanno risalire il fenomeno alla durata dell'impulso: più lento è il picco, quindi l'attivazione delle fibre, maggiore sarà la latenza (Valeriani et al. 2012).

È bene ricordare che si tratta di potenziali evento-correlati, cioè dipendenti dall'attenzione del soggetto nella loro ampiezza, per cui si consiglia di mantenere lo stimolato vigile con piccoli compiti come contare gli stimoli.

Il laser così come è utilizzato non è in grado di isolare la componente C, ma vari metodi sono stati tentati per stimolare selettivamente queste fibre (C-LEP): blocchi selettivi da compressione; stimolazione di piccole aree di cute (<0,5 mm), usando un foglio d'alluminio bucato, ad esempio, al fine di sfruttare la maggiore concentrazione epidermica di fibre C; analisi spettrale della finestra in cui le si attende; stimolazione di ampie aree a bassa intensità, magari riscaldando la cute a 40°C per abbassare la soglia delle C. I risultati sono tuttavia scadenti (Treede, Lorenz, e Baumgärtner 2003). Le ragioni sono state via via assegnate a fattori diversi, come l'inibizione A δ -mediata, il basso rapporto segnale/rumore, la depressione attentiva dell'ampiezza o il *time-jitter* (Lefaucheur 2019). La superficie stimolata è variabile, di norma un'area circolare sui 3-5 mm di diametro e l'impulso ha durata media di 3 ms, variabile tra 1 e 100ms. Il trasferimento radiante di energia aumenta la temperatura locale rapidamente fino a 69-87°C, poi questa cala più lenta per raggiungere i 46°C. La dinamica della variazione della temperatura fa pensare che ad essere attivati siano preferibilmente i nocicettori CMH, ma anche una parte di AMH, le I. Questo d'altronde si può dedurre dal fatto che le latenze corticali dei PREP siano riconducibili alla finestra delle A δ , più che delle C, con picchi a 800-1000 ms (Treede, Lorenz, e Baumgärtner 2003).

Come detto i LEPs sono alla fine stati accettati come il metodo *gold standard* per la valutazione del dolore, ma ciò non sta a significare che siano privi di difetti, né che altri tipi di stimolazione siano stati del tutto abbandonati.

Nella realtà clinica, infatti, anche con questo dispositivo, si concretizzano una serie di problematiche del tutto impellenti da risolvere:

- Il laser è ingombrante, costoso, richiede occhiali protettivi per medico e paziente e necessita di un esperto per essere utilizzato

- Essendo cutilesivo se usato scorrettamente, occorre osservare una serie di precauzioni:

1. Lo stimolo deve essere costantemente variato di posizione, il che comporta una minore standardizzazione e ripetibilità a livello centrale e generalmente permette un numero molto basso di stimolazioni, 20-30, dovendo limitarsi ad un certo distretto.
2. Il laser preferito è diventato il Nd:YAP, meno cutilesivo; ma questo è dovuto alla più lenta salita della curva termica, con potenziali evocati di ampiezza ridotta e un riscaldamento minore e più diffuso, anche fino a 1 mm di profondità. Come dimostrato nel ratto (S. Leandri e G. Lunardi 2008), un aumento pur contenuto di temperatura, anche di 3,8-6,4°C nel derma, ovvero 6-10°C in superficie, è stimolo sufficiente alla depolarizzazione di assoni non solo termo-specifici AMH e CMH, ma anche di fibre più grandi, A β . Questo comporta una perdita di selettività ben nota per questo tipo di laser (Lefaucheur 2019).
3. I LEP non sono praticati negli USA proprio per le potenziali lesioni che possono provocare.

-La superficie stimolata è piccola, con pochi recettori attivati e dunque deboli risposte corticali.

-Subisce l'influenza della pigmentazione cutanea.

-Anche se non ha artefatto di stimolo, tuttavia mancano le componenti più precoci e ciò non permette di distinguere il livello della lesione in caso di danno al sistema nervoso.

Stimolazione di sito specifico con corrente elettrica

Possiamo distinguere due siti in cui si è tentato di stimolare specificamente le fibre: il distretto di conduzione e quello recettoriale.

Distretto di conduzione: Intraneural microstimulation

Per la prima volta nel 1984 fu pubblicato un articolo sulla possibilità di usare aghi da microneurografia per stimolare selettivamente fibre nervose, registrando poi a livello corticale le risposte. Il risultato furono componenti tra i 100 e 400ms in Cz, dipendentemente dal sito di stimolo, a volte precedute da onde precoci controlaterali.

A parte la non praticità ed invasività della metodica, sorsero dubbi sull'origine cognitiva delle onde tardive, a causa della intensità della sensazione evocata. È inoltre chiaro che senza specifici mezzi di selettività oltre la dimensione dell'ago, rimane abbastanza scontata l'attivazione di fibre A β , a più bassa soglia, non già direttamente per via della corrente, ma anche indirettamente per induzione di flusso di cariche da parte del campo magnetico.

Distretto di ricezione

Certamente è questa la modalità che ha avuto più fortuna nel corso del tempo, comprendendo oggi anche metodiche clinicamente applicate, se vi si include il laser, e sperimentalmente più promettenti.

In realtà questo discorso vale fundamentalmente per l'epidermide, poiché la cornea, la polpa dentale, che peraltro sembra contenere rade terminazioni A β , o le mucose viscerali, di cui si è già detto sopra, per motivi soprattutto di disagio del paziente e di fattibilità clinica o sono state abbandonate o sono state ridimensionate allo studio di casi molto particolari.

Alcuni elementi sono da considerare per una stimolazione elettrica sufficientemente selettiva in epidermide (Lefaucheur 2019):

1. L'intensità dello stimolo correla direttamente colla profondità che può raggiungere. Per una buona selettività bisogna rimanere su basse correnti, generalmente 1,5 volte la soglia percettiva.
2. La durata dello stimolo dovrebbe essere di 4, 5, a volte 10 ms (Leandri et al. 2018). Maggiore è la durata dello stimolo maggiore in genere l'ampiezza del potenziale evocato corticale, senza per questo accorciare la latenza, cioè reclutare A β .
3. Aumentando la distanza tra gli elettrodi lo stimolo raggiunge una maggiore profondità. Servono quindi elettrodi molto ravvicinati, possibilmente a distanze micrometriche.

4. L'area di stimolazione correla invece colla significatività e riproducibilità dei potenziali evocati in quanto maggiore è l'area, maggiore è il numero di fibre stimulate, quindi l'ampiezza della *volet* ascendente.

Elettrodi ad ago

I primi rudimentali tentativi di stimolare selettivamente l'epidermide risalgono agli anni '80. Si era tentato di ottenere selettività inserendo un elettrodo di 1,5 mm di diametro in un pozzetto ricavato con trapano da dentista, profondo 1 mm. L'anodo consisteva di un anello posto alla base del dito stimolato, quindi con una distanza interelettrodica di alcuni millimetri (Bromm e Meier 1984). Con intensità molto basse (0,3 mA) e impulso di lunga durata (16-20ms) si otteneva una sensazione di puntura di spillo. Ma come per la microneurografia, benché l'elettrodo fosse stato fisicamente ben collocato, ciò non escludeva che la diffusione di corrente e campo magnetico attivasse le fibre A β . Infatti, i potenziali evocati erano a breve latenza, con picchi a 30-40 ms.

Un più promettente risultato fu conseguito con un elettrodo ad ago, quindi non necessitante di pozzetto, da Inui et al. nel 2002. L'ago fungeva da catodo e un anello legato attorno alla regione stimolata, la punta di un dito, rappresentava l'anodo. Piccolo (0,5 mm di diametro), superficiale (0,2 mm) stimolava anch'esso a basse correnti (0,2 mA), ma con durate inferiori (1 ms).

In montaggio 10-20, le risposte di vertice registrate cadevano come P1 a 245-341 ms, per una velocità di conduzione sui 15 m/s, compatibili con una stimolazione A δ (Inui et al. 2002).

Lo stesso gruppo e molti altri lavorarono sull'elettrodo elaborandone nuove forme, con ago ancora meno profondo, superficie più ampia, fino ad arrivare ad un elettrodo concentrico di 1,2 cm, con anodo circolare periferico e catodo stimolante centrale, che penetrava 0,025-0,1 mm. Inui allungò poi la durata dello stimolo a 20 ms totali, di onde triangolari.

Il metodo rimase cruento, benché minimamente; inoltre la superficie di stimolazione era molto piccola, puntiforme (circa 0,5 mm), poiché comunque essa non corrispondeva a quella dell'intero elettrodo, ma si sovrapponeva al catodo centrale. Sulla superficialità dello stimolo, poi, non c'era ragione di pensare che fosse granché aumentata, dato che pur sempre si penetrava l'epidermide.

Preso coscienza che una superficie aghiforme non garantisse lo standard ideale di stimolazione, così come che servisse un metodo per gestire meglio la diffusione del campo elettrico e magnetico somministrato, si progettaronu nuovi dispositivi.

Elettrodo concentrico

L'elettrodo concentrico (Katsarava et al. 2006) costituì per molti aspetti un passo avanti rispetto alle tecniche descritte poc'anzi. Si tratta di una testina in polimero isolante su cui poggiano un catodo centrale di 0,5 mm circondato, a distanza di 5 mm, da un anodo

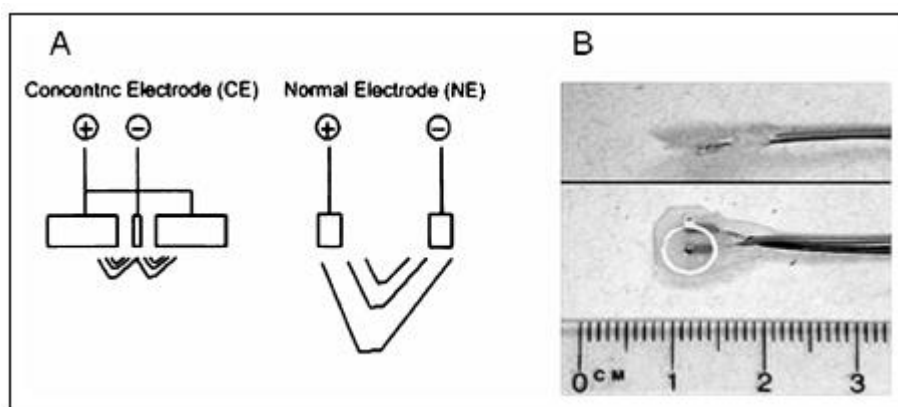


Figura 4. Elettrodo concentrico con dimensione a confronto a sinistra; suo campo elettrico ipotizzato dagli sviluppatori a destra. Quest'ultimo sarà poi dimostrato non corrispondere a realtà.

circolare filiforme (vedi fig. 4). Siccome il campo elettrico si propaga con linee semicircolari tra i due poli con convessità verso il basso, come da immagine sopra, la superficie stimolata non corrispondeva più al catodo puntiforme ma all'intera superficie compresa tra catodo ed anodo, cioè 19,6 mm². Nell'esperimento che lo lanciò, la stimolazione venne fatta a 1,5 volte la soglia, variabile di norma tra 0,2 e 2 mA, con 15 singoli o doppi impulsi di 0,5 ms di durata ciascuno, separati di 12-18 ms, per evitare adattamento. L'elettrodo doveva essere appoggiato alla cute per funzionare e questo non escludeva la possibilità di costimolazione tattile delle fibre A β .

La registrazione veniva effettuata sullo scalpo in Cz riferita a Au1-2 connessi assieme. Lo studio comprendeva anche una fase di stimolazione dopo applicazione di EMLA locale e una serie di combinazioni tra siti e numero di elettrodi utilizzati per vagliare le variazioni di intensità in seguito a un'ipotetica sommazione spaziale e temporale. La stimolazione del dorso della mano evocò a livello corticale un'onda bifasica negativa-positiva con picco N a 149,2 \pm 14,0 ms e un seguente picco P a 181,1 \pm 21,5 ms, con ampiezze di 12,2 \pm 4,0 μ V. La latenza minore rispetto ai LEP si fece risalire alla brevissima durata dell'impulso e al fatto che non vi erano ritardi nell'attivazione dei recettori.

I test di sommazione temporale e spaziale dimostrarono l'incremento di ampiezza, come previsto, dei potenziali evocati.

Il blocco selettivo delle fibre dolorifiche con EMLA si associava a scomparsa dei potenziali così come descritti.

Di primo acchito si ebbe l'impressione di aver trovato un nuovo metodo comodo ed efficace per stimolare le fibre intraepidermiche in vari distretti, con poco costo, nessuna lesività ed alta riproducibilità.

Tuttavia, come successivamente dimostrato (Leandri et al. 2018) sulla base di sospetti già sorti negli anni precedenti, l'elettrodo non è selettivo così come si sperava. Usando il metodo della simulazione degli elementi finiti su computer, infatti, si è giunti a dimostrare che:

4. Il campo elettrico ipotizzato dai creatori del concentrico non ha una forma semicircolare, ma esso è di fatto rilevante solo in corrispondenza del catodo aghiforme e dell'anodo circolare, riducendo quindi di molto la superficie stimolante.
5. La profondità del campo è eccessiva, raggiungendo gli 0,95 mm, cioè oltre lo strato epidermico, spesso solo 400 μm in media. Si escluse, quindi, la selettività per le piccole fibre. Il fatto si doveva alla eccessiva distanza tra anodo e catodo, che implicava di dover aumentare di intensità per ottenere la percezione a tal punto da attivare anche le fibre più profonde.

Ma come sempre succede in ambito di ricerca, il fatto che siano forniti dei precedenti offre, se non altro, spunti di riflessione per nuove idee. L'elettrodo interdigitato nasce, infatti, nel solco tracciato dai suoi predecessori.

b. Strumenti e metodi per le nostre evidenze

L'elettrodo interdigitato

Ad ultimo arriviamo alla parte di più stringente interesse ai fini di questo testo. Infatti, i dati di poi riportati sono tutti stati ottenuti attraverso la stimolazione con un elettrodo di ultima generazione. Si tratta dell'elettrodo interdigitato.

Si tratta di un piccolo dispositivo composto da una testina piatta in resina epossidica su cui sono stampate alcune piste in oro a guisa di pettine. I pettini sono due, ognuno connesso ad un polo, e i loro denti si embricano assieme. Il termine "interdigitato" è una traduzione diretta dell'inglese "*interdigitated*", "intrecciato", con lo specifico proposito

di mantenere l'originale immagine delle dita di due mani che si intrecciano. Quest'immagine è la disposizione esatta che è stata data ai due gruppi di piste stampate sulla resina (vedi fig. 5).

Le due serie sono connesse con cavetti di colore diverso, solitamente uno nero, l'anodo, e uno rosso o di altro colore, per il catodo; questi terminano in due connettori *touch-proof*. La distanza fra le piste è il vero ritrovato originale di quello che d'ora in poi si chiamerà solo IDE (*Interdigitated electrode*). Dell'IDE, infatti, esistono due modelli, anche se poi solo uno ha passato i test di prova: IDE 150 e IDE 1000, in cui le singole piste, positive e negative, si alternano ad intervallo costante di 150 e 1000 μm rispettivamente. La distanza tra le piste è cruciale, perché, come già riportato sopra (Lefaucheur 2019), maggiore è la distanza tra catodo ed anodo, maggiore sarà la profondità del campo elettrico generato, quindi maggiore il rischio di perdere selettività per le piccole fibre. Nel medesimo studio in cui è stato dimostrato col metodo degli elementi finiti che l'elettrodo concentrico non è selettivo (Leandri et al. 2018), sono stati anche introdotti e testati IDE 150 e IDE 1000. Per il primo la stessa analisi ha fornito valori di approfondimento cutaneo di massimo 350 μm , per il secondo circa il doppio, 700 μm . Pertanto, solo l'IDE 150 ha dimostrato di rimanere superficiale e selettivo, mentre l'IDE 1000 non ha fatto altrettanto. Di conseguenza, d'ora in poi si tratterà solo di IDE 150, perché dimostrato selettivo e perché elettrodo di scelta per questa tesi.

Per completezza, esistono alcune altre varianti dell'elettrodo: la superficie di contatto, infatti, è disponibile con lato da 1 o 2 cm, quindi con area di stimolazione complessiva rispettivamente di 1 e 4 cm^2 . La differenza è inerente al numero di fibre stimolate e dunque correla coll'ampiezza delle risposte corticale e la possibilità di evocare un segnale significativo. L'IDE da 4 cm^2 dovrebbe evocare risposte più ampie e quello da 1 meno ampie. Tuttavia, per la raccolta dati si è optato per l'uso della testina da 1 cm^2 , considerando la maggiore praticità a fronte di risposte corticali comunque significative. Ciò non significa che la testina da 4 cm^2 debba essere scartata: stimolazioni successive con questa potrebbero rivelarsi altrettanto, se non più significative.

Un'altra variabile riguardante la testina è la sua flessibilità. La resina dello studio di presentazione era rigida e quindi la testina indeformabile. Benché questo non costituisca un ostacolo al suo utilizzo nelle stimolazioni superficiali di aree come il dorso della mano, tuttavia potrebbe ridurre l'aderenza delle piste alla cute in zone più impervie da raggiungere. Per questo è stato sviluppato, dalla stessa ditta di Firenze presso cui ci si è affidati per lo sviluppo dei prototipi (Bionen S.a.s.), un nuovo modello di IDE 150

flessibile, con una superficie di contatto peraltro intermedia tra 1 e 4 cm² (1,5x1,5cm, quindi 2,25 cm²).

Le tipologie prima descritte dell'elettrodo sono riportate nelle immagini sottostanti, dove, da destra a sinistra, è possibile vedere la parte stimolante, cioè quella su cui sono stampate le piste da rivolgere verso la superficie cutanea, di: IDE 150 da 4 cm² rigido, 2,25 cm² flessibile e 1 cm² rigido, quest'ultimo usato sui volontari studiati per la tesi.

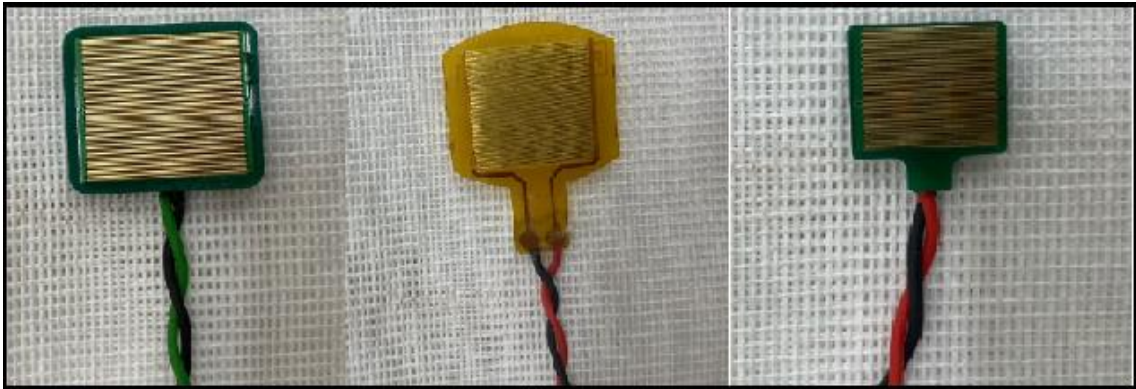


Figura 5. Diverse tipologie di IDE a confronto: 150 2x2 cm rigido (a destra); 150 1,5x1,5 cm flessibile (al centro); 150 1x1 cm rigido (a sinistra).

Solo due sono gli studi ad oggi pubblicati sull'IDE, uno del 2018, in cui lo si introduceva come nuova metodica di studio selettiva e un secondo del 2020.

Il primo lavoro ha tra i suoi autori i creatori dell'elettrodo e riportava le prime evidenze di selettività dell'IDE. Nel corso dei test si sono usati l'IDE 150, l'IDE 1000 e placche autoadesive per PESS su dorso della mano, tra primo e secondo osso metacarpale dopo pretrattamento della cute con etanolo, per disidratarla.

L'applicazione diretta dell'elettrodo s'associava a impedenza variabile da 3 a 7 Kohm, soglia a 2-5 mA per IDE 150 e 1-2 per il 1000, probabilmente per attivazione delle fibre A β , a più bassa soglia. La registrazione avveniva in C3-C4 riferiti a Fz e Cz riferito a Au_c. Erano state effettuate sia la stimolazione random di 20-30 stimoli, sia la stimolazione cadenzata ogni 0,7 secondi per 500 stimoli, come treno di stimoli fino a 8. La stimolazione ripetitiva aveva prodotto una sola componente, indicata come N1 a $91,4 \pm 12,0$ ms, mentre la stimolazione random aveva generato onde anche più tardive, N2/P2, simili a quelle da LEP.

Un'altra relevantissima parte, tuttavia, era stata introdotta in discussione, dove per la prima volta, potendo disporre di un mezzo selettivo e capace di grandi numeri di stimolazioni consecutive senza danno e senza dover cambiare sede, si proponeva di indagare le risposte precoci a breve e media latenza.

La possibilità di affrancarsi da risposte *event-related* nello studio dei PREPs è quantomai auspicabile. Infatti, come già detto, non solo le ipotesi sulle sorgenti di questi sono affatto

ipotetiche (Helfrich e Knight 2019), ma sono potenziali fortemente condizionati dall'attenzione del soggetto e non esprimono un stima quantitativa né qualitativa dello stimolo, essendo, nei fatti, aspecifici.

Nel secondo studio (Di Stefano et al. 2020) l'elettrodo è stato testato per la sua selettività in diversi modi. Innanzitutto, si è stabilita la soglia per i 22 soggetti sani arruolati, poi si è convenuto di stimolare a 2-2,5 volte la soglia di ognuno, registrando con 32 elettrodi in disposizione 10-20 riferiti al nasion (Nz) e filtrati come da EEG standard (1-30 Hz). Si è comparato innanzitutto il tracciato di una stimolazione al laser Nd:YAP con quella da IDE 150 stimolando dorso della mano e labbro superiore. Poi si è verificata la velocità di conduzione delle fibre stimulate con una stimolazione in tre punti consecutivi a 20 cm di distanza dell'arto superiore (dorso mano, avambraccio e braccio); infine si è stimolato dopo blocco selettivo delle piccole fibre con lidocaina perinervosa a livello del dorso della mano tra primo e secondo osso metacarpale. Importante sottolineare ai fini di un successivo confronto che la impedenza di stimolazione fosse 5 Kohm di media e che l'elettrodo sia stato apposto direttamente sulla cute.

In questo articolo, inoltre, si era già provato l'elettrodo in condizioni per certo patologiche, provando l'IDE su tre soggetti con danni nervosi localizzati a livelli consecutivi lungo la via di trasmissione nocicettiva: un paziente con neuropatia amiloidosica cutanea con grave depauperamento istologico delle piccole fibre, una paziente con siringomielia e conseguente dissociazione midollare, un paziente con sindrome di Wallenberg, anch'egli con deficit del termotatto e nocicezione, assieme a dolore neuropatico risultante.

La soglia media si è attestata sui $3,2 \pm 0,9$ mA per uno stimolo a carattere puntorio, segno di attività $A\delta$. Le risposte corticali erano onde N2/P2 e N1 riproducibili senza attività significativa in finestra β , da mano, rispettivamente, di $169,0 \pm 23,1$ e $131,6 \pm 22,4$ ms. Questi sono i risultati di stimolazioni a bassa intensità, mentre altri, derivanti da alte intensità, hanno latenza minore, forse per coinvolgimento $A\beta$.

Le ampiezze hanno dimostrato di rientrare nello standard per PREP a partire da una certa soglia: risposte di 5-6 μV , a differenza di quelle evocate con elettrodi non selettivi, che invece generavano potenziali da 10 a 35 μV , senza soglia, crescenti al crescere della intensità di stimolazione.

Rispetto al laser, le latenze erano minori. Anche se non è poi risultata una differenza significativa, è stato ipotizzato dagli autori che il fatto fosse dovuto alla maggiore durata dello stimolo con laser, data la modalità con cui attiva le fibre. In realtà si può ritenere, visto che il campione studiato era piccolo (19 soggetti sani), che questa differenza esista

davvero e sia dovuta, come già scritto, alla mancanza di selettività proprio del modello di laser impiegato in questo lavoro, il Nd:YAP.

La velocità media calcolata si attestava sui $12,3 \pm 5,2$ m/s, nel range delle piccole fibre mielinizzate.

Dopo blocco selettivo con lidocaina le risposte corticale IDE-relate scomparivano e mancavano pure nei tre pazienti nelle zone in cui ci si aspettava una alterata nocicezione.

Accorgimenti e restante strumentazione

Nel praticare la stimolazione sui volontari studiati per questa tesi, si è affrontata una importante questione tecnica: la modalità con cui l'elettrodo viene fatto aderire alla cute. Infatti, negli articoli sull'applicazione delle varie tecniche di stimolazione descritte, IDE compreso, o esisteva la possibilità di fissare il dispositivo in virtù della penetrazione cutanea necessaria al funzionamento (elettrodi ad ago) o si sorvolava sulla questione. Solo in Leandri et al. (2018) si riportava l'uso di soluzione alcolica per pretrattare la cute del sito di stimolazione.

In realtà il fissaggio dell'elettrodo sulla cute è un passaggio importante perché ha risvolti diretti sulla soglia percettiva e l'intensità, nonché sulla profondità di penetrazione del campo elettrico.

Bisogna infatti immaginare che cute ed elettrodo non penetrante siano separati da uno spazio virtuale. Questo spazio è irregolare perché irregolare è la superficie cutanea. Per ottenere una migliore stimolazione si è pensato che un riempitivo potesse regolarizzare l'intercapedine di contatto. Ma provando più volte con questo stratagemma si è compreso che il materiale interposto non è solo riempitivo, ma in parte impatta sulla adeguata trasmissione dell'impulso. Infatti, cute, elettrodo e contenuto dello spazio virtuale costituiscono i tre elementi di un condensatore, rispettivamente le due armature e il mezzo dielettrico. Mentre possiamo assumere le due armature a composizione circa costante e la carica dell'armatura a monte predefinita dall'operatore, così non si può dire del dielettrico. Difatti, lo spazio virtuale, di base, è costituito dal film idrolipidico che riveste la cute di ognuno. La composizione di detto film è però variabile a riguardo di due fattori:

1. La intrinseca capacità degli annessi del soggetto di generarlo e mantenerlo, insieme alla qualità della cute sottostante. È evidente, infatti, che l'idratazione della cute varia da persona a persona e, tra l'altro, si fa più secca coll'età; inoltre una cute macerata o variamente alterata da patologie non si presta bene per questo

tipo di indagini, cosa che, a differenza del semplice stato di lubrificazione cutanea, complica anche l'esecuzione dei LEP.

2. Indipendentemente dalla produzione basale del film, che varia consistentemente solo per stimoli prolungati, come ad esempio certe stimolazioni ormonali (in ipotiroidismo, ad esempio, la cute è secca e cretacea), lo stato di idratazione dello stesso è rapido a modificarsi. Ciò sta a dire che la sudorazione eccrina della superficie stimolata può influire sulla stimolazione nel mentre che quest'ultima viene eseguita, prima ancora che tra una seduta e l'altra. Se il film si imbibisce del sudore prodotto sotto l'elettrodo la dispersione della corrente in senso tangenziale alla cute aumenta fino a cortocircuitare lo stimolo, ovvero s'impedisce del tutto alle cariche di raggiungere le fibre.

Si consideri che la stimolazione elettrica, la percezione puntoria e l'impossibilità all'evaporazione comportata dalla testina dell'elettrodo sono tutti importanti fattori che contribuiscono a inumidire il dielettrico. Pertanto, quello della sudorazione è un problema che ci si è trovati a fronteggiare nel corso delle stimolazioni, soprattutto per i soggetti più giovani e durante l'estate.

Una serie di accorgimenti si sono adottati in merito:

- Innanzitutto, si è cercato di standardizzare l'ambiente, affinché la temperatura rimanesse circa costante in ogni stagione per mezzo di sistemi di condizionamento e riscaldamento.
- Si è cercato di limitare l'attività fisica del volontario per ridurre al minimo le possibili cause di sudorazione, mettendo lo stimolato complessivamente a suo agio.
- Col fine di disidratare la zona di stimolo, si è pretrattata la cute frizionandola con acetone e lasciando asciugare prima d'applicare l'elettrodo.
- Infine, come intervento di certo più impattante, si è deciso d'interporre un mezzo dielettrico da noi scelto tra cute ed elettrodo.

Il mezzo dielettrico in questione è vaselina ovvero paraffina in pasta. La scelta è dovuta all'idrofobicità della sostanza e alle sue discrete proprietà isolanti.

Siccome, infatti, maggiore è il potere isolante, maggiore è la resistenza offerta al flusso di cariche da un'armatura all'altra, per mantenere valori d'impedenza ideali (10-50 Kohm) si ha avuto bisogno di usare un materiale che offrisse solo un certo grado di impedimento a fronte di una buona omogeneizzazione dello spazio del dielettrico.

A corrente costante, resistenze eccessive sono associate, per la prima legge di Ohm, a tensioni necessarie per ottenere la percezione anch'esse eccessive.

D'altro canto, resistenze molto ridotte comportano il passaggio di correnti assai elevate con due conseguenze:

- Correnti sostenute >10 mA rischiano di bruciare le piste dell'elettrodo, obbligando alla sostituzione.
- Correnti elevate generano nel dielettrico una elettroporazione, ovvero la formazione di nanopori sotto la pressione degli elettroni. È questo un fenomeno improvviso che fa crollare l'impedenza e causa con ciò una brusca riduzione della soglia percettiva, comportando per il paziente una sensazione dolorosa inaspettata. Richiede di abbassare subito l'intensità dello stimolo a soglia accettabile e spesso altera significativamente il dielettrico a causa dell'abbondante sudorazione riflessa che comporta.

La vaselina permette di mantenere la resistenza di interfaccia elettrodo-cute abbastanza costante, ma non manca di alcuni difetti:

- Si è cercato di standardizzare semiquantitativamente la porzione di unguento applicata, ma questa in parte variava pur sempre da una stimolazione all'altra, il che ha impedito di avere una impedenza costante tra i soggetti.
- La vaselina non è perfettamente idrofoba e, seppur con lentezza, si imbibisce del sudore prodotto frattanto. Questo comporta che ci sia una variabilità non solo inter-soggetto, ma anche intra-soggetto dei valori di impedenza.

Benché non perfetto, l'unguento di vaselina ha permesso comunque di mantenere una buona percezione nel corso della registrazione.

Per mantenere in sede la testina è stato necessario applicare nastro adesivo, possibilmente una singola striscia e senza esercitare eccessiva pressione.

In generale, comunque, il fatto che esista contatto con la cute non comporta significativa attività $A\beta$ e questo perché l'elettrodo è fissato su di essa e non viene costantemente spostato, come succede invece per la placca Peltier o come usavano fare gli ideatori dell'elettrodo concentrico nel loro studio.

Nei nostri esperimenti l'IDE 150 1x1 cm rigido con vaselina e scotch è stato collegato a un'Interfaccia di stimolazione o stimolatore di grado medicale (Digitimer®-DS7A, Ltd, UK). L'interfaccia è stata impostata in modo che generasse impulsi ad onda quadra di 200 μ s di durata, a potenziale limitato, massimo di 200 V. La stimolazione avveniva a corrente costante, ovvero, nel corso della seduta era possibile settare a piacimento un'intensità tra 0 e 99,9 mA che l'apparecchio manteneva costante variando la tensione in funzione della resistenza.

Tuttavia, lo stimolatore non offriva tutte le soluzioni del caso. Lo stimolo, infatti, non doveva essere costituito da un singolo impulso da 200 μ s, ma da un treno di impulsi, intervallati ognuno di 800 μ s, per una durata totale del singolo impulso di 1 ms nel contesto di un treno da 10 ms, cioè 10 impulsi.

La ragione di questa scelta ricade su quanto detto in precedenza (Lefaucheur 2019) riguardo gli accorgimenti per ottenere selettività dello stimolo: stimoli prolungati hanno maggiore possibilità di attivare le piccole fibre. La sequenza di impulsi, infatti, subisce un inviluppo nel suo trasferimento attraverso il dielettrico e lo strato corneo. L'inviluppo

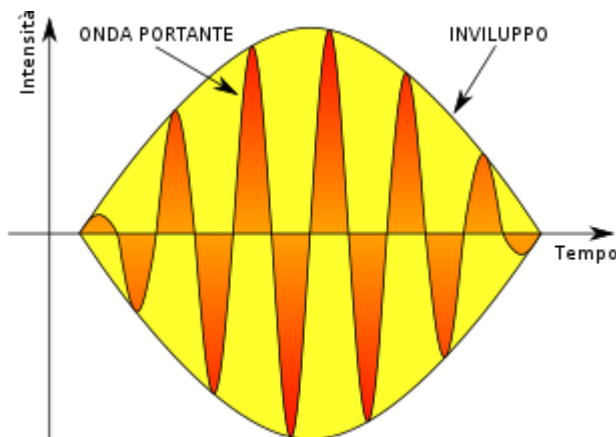


Figura 6. Rappresentazione schematica di inviluppo d'onda. Si immagini che l'asse delle ascisse sia il margine esterno dell'epidermide e che l'inviluppo delle onde positive sia trasferito al di sotto di quello nell'epidermide.

è l'esito del fenomeno fisico della dispersione e consiste nell'allungamento della forma o fronte d'onda di un segnale che si propaga in un mezzo appunto detto "dispersivo", come illustrato in fig. 6 («Principio di indeterminazione tonale» 2020).

Il fenomeno conserva l'energia trasportata dal segnale. Il pacchetto di onde viene quindi ricevuto dalle piccole fibre come un segnale di 10ms.

Questo avviene grazie ad una frequenza portante, 1 kHz in questo caso, che veicola una frequenza modulante integra attraverso il mezzo dispersivo, l'epidermide, ovvero la "porta", appunto, oltre di quello. Tale frequenza modulante è poi il segnale che si vuole stimolare la fibra. È questa una modulazione detta "in ampiezza".

Tanto è necessario per ottenere uno stimolo alla fibra di 10 ms di durata. Infatti, fornire alla cute direttamente uno stimolo singolo da 10 ms non varrebbe lo stesso presso la fibra. Ciò si spiega per l'alta resistenza dello strato corneo che condiziona un tipo di trasmissione capacitiva, che veicolerebbe alla fibra un segnale con tipica forma a condensatore in scarico, con un picco iniziale e una curva successiva di attenuazione, del tutto dissimile da un'onda quadra che è invece ciò che si desidera.

Siccome lo stimolatore non consentiva di erogare treni di impulsi, l'associazione con un generatore di treni introduceva questa possibilità (TTi 25 MHz Function/Arbitrary/Pulse Generator-TG2511-LXI).

Tuttavia, il generatore di treni non era in grado di regolare la cadenza dei treni che generava: aveva bisogno di un *trigger* esterno. Per questo, grazie alla funzione *external source* è stato possibile subordinarlo ad un generatore di *trigger*. Il dispositivo è stato

realizzato *in loco*, e di per sé genera impulsi ad onda quadra di 1 ms di 5 V di ampiezza, manualmente o a frequenza regolabile.

Per le registrazioni qui riportate si è utilizzata una frequenza automatica fissa di 2 Hz. La scelta dei 2 Hz deriva dalla necessità di mediare due necessità:

- Non stimolare con eccessiva frequenza: ciò evita di affaticare le piccole fibre, permette una migliore sincronizzazione tra stimolo e registrazione e abbatte le risposte corticali lente. Ad ultimo, una frequenza discriminabile per il soggetto stimolato permette di distinguere se la percezione sia puntoria, tipica delle fibre A δ o continua, riconducibile alle C.
- Acquisire le risposte corticali con sufficiente rapidità affinché la seduta non duri troppo a lungo, pena la perdita di significatività delle onde a causa della stanchezza del soggetto e del deteriorarsi del dielettrico.

Il soggetto veniva fatto accomodare supino su di un lettino, con il capo sollevato di circa 30°, appoggiato su di un cuscino col margine inferiore sotto la nuca.

La ragione di questi accorgimenti era di ottenere la massima comodità col fine di diminuire il più possibile il tono dei muscoli della regione cervico-nucale, riducendo quindi gli artefatti derivanti dalla loro contrazione.

Inoltre, si chiedeva al volontario di rimanere ad occhi chiusi, immobile, rilassato, con la bocca dischiusa per mantenere decontratti i muscoli masticatori.

L'elettrodo è stato posizionato sulla cute del dorso della mano tra primo e secondo osso metacarpale previo trattamento della cute con acetone e apposizione di sottile stato di vaselina.

Per la registrazione si sono usati due elettrodi sottocutanei ad ago, con registrante in C3 o C4, in dipendenza dal fatto che fosse stimolata la mano destra o sinistra, e riferimento in Fz. La scelta di Fz come riferimento ha comportato che si dovesse fare attenzione agli artefatti frontali. Questi derivano principalmente dalla contrazione del muscolo frontale in seguito a tensione nervosa, come in caso di seduta di durata eccessiva e dolore o fastidio. Quest'ultimo di norma derivava o dall'eccessiva intensità di



Figura 7. Schematizzazione dei dispositivi in serie utilizzati nel corso delle registrazioni.

stimolazione o dal *tirage* dell'elettrodo frontale. È pertanto necessario che il soggetto si senta a proprio agio sia per la parte dell'elettrodo che per la parte degli aghi a scalp.

Come riferimento di massa dell'amplificatore, isolato da terra, è stato usato un terzo cavo collegato ad una fascetta bagnata adattabile e fissata a metà dell'avambraccio.

Una volta preparato il soggetto è stata appuntata la distanza tra sito di stimolazione e corteccia somatosensoriale primaria, approssimandola alla distanza tra testina dell'elettrodo ed eminenza di C5 alla base del collo posteriormente, cui si è sommata una distanza presunta standard fissa di 20 cm, da quel punto del midollo spinale alla SI.

Grazie a questa distanza è stato possibile stimare la velocità di conduzione delle fibre in m/s usando la semplice formula distanza (mm)/latenza dell'onda (ms).

L'elettrodo di riferimento è stato collegato all'ingresso invertente e quello registrante al non invertente di un amplificatore differenziale con banda passante di 0,1-2000Hz, con accluso un filtro analogico Butterworth di secondo ordine (LT Bioamplifiers by Vertigo, Genova, Italy) perché fosse amplificato di 100.000 volte.

La registrazione avveniva su di un unico canale, il primo, dell'amplificatore collegato a un convertitore analogico-digitale (NI PCIe-6320, X Series Multifunction DAQ, 16 bit, 250 KS/s sampling rate by National Instruments Austin, Texas). Questo, infine, era collegato ad un computer che analizzava i dati attraverso un software di elaborazione del segnale programmato appositamente e basato sul linguaggio grafico di Labview® 2014, che acquisiva 25.000 campioni in 1 sec in seguito a ogni stimolo, come da immagine a fianco (vedi fig. 7 per una revisione schematica di quanto esposto).

Per ognuno dei soggetti riportati si sono eseguite tre fasi di stimolazione:

1. Stimolazioni a 1,5 volte la soglia percettiva, con treni da dieci impulsi, con IDE fino ad ottenere almeno 1024 risposte, registrate dal programma. Il programma registrava anche i valori di intensità, tensione, e impedenza. Ci si è sempre curati che l'impedenza rimanesse sopra i 10 Kohm, nonostante calasse regolarmente con l'imbibizione progressiva della vaselina. Infatti, si è verificato coll'esperienza che sotto questa soglia compaiono significative variazioni della percezione dello stimolo, probabilmente per un eccessivo approfondimento del campo elettrico.
2. stimolazioni a 1,5 volte la soglia percettiva, con treni da 10 impulsi, servendosi



Figura 8. Elettrodi a coppetta per la stimolazione non topograficamente selettiva di confronto all'IDE.

però di elettrodi a coppette da 1 cm di diametro (vedi fig. 8), collegati all'apparato su descritto al posto dell'IDE. Gli elettrodi erano due, uno catodico, l'altro anodico, sistemati a circa 1 cm di distanza

l'uno dall'altro. L'applicazione era avvenuta sulla cute nello stesso punto dell'IDE, previa pulizia dell'area con acetone, per disidratare e rimuovere i residui di vaselina. Tra cute ed elettrodo è stata interposta della pasta conduttrice (Neurogel®) onde facilitare la trasmissione in profondità del segnale e garantire una buona stimolazione delle A β . Anche in questo caso è stato necessario applicare nastro adesivo al fine di tenere gli elettrodi in sede. In questa fase le risposte registrate sono 512, comunque significative.

3. Stimolazioni a 1,5 volte la soglia percettiva, senza variare elettrodi, ma passando dal treno a dieci impulsi a un singolo impulso (200 μ s). Così facendo si è aumentata ancor di più la possibilità di stimolare le fibre A β e si è ridotto il reclutamento delle fibre A δ . Per la stessa ragione del punto 2 si è deciso, sempre per evitare di protrarre la seduta troppo a lungo, di ottenere circa 512 risposte.

Si è disposto l'esperimento in queste tre fasi per avere tracciati di confronto non solo rispetto alle risposte ottenute con IDE tra loro, ma anche per dimostrare ancora una volta la sua selettività per le piccole fibre rispetto a elettrodi palesemente aspecifici, come sono le coppette. Per queste, infatti, la distanza tra i due poli è stata volutamente mantenuta ampia, quasi 100 volte maggiore quella che intercorre tra le piste dell'IDE150.

La sensazione riferita dai soggetti a seguito di stimolazione con coppette è stata, prevedibilmente, tattile, descritta come un lieve tocco. È opportuno riportare che alcuni soggetti riferivano all'inizio anche una sensazione puntoria assieme alla tattile, che migliorava a intensità di stimolazione più basse e risolveva sistemando gli elettrodi, aumentandone la distanza o aggiungendo pasta conduttrice. Ciò è riconducibile al fatto che le coppette, sebbene stimolino in modo aspecifico le fibre più superficiali, stimolano anche le piccole fibre.

Tuttavia lo scopo di questi dati non è solo corroborare di ulteriori prove la tesi della selettività dell'elettrodo, ma anche e soprattutto quello di raccogliere il suggerimento espresso nella discussione dell'articolo di presentazione dell'IDE (Leandri et al. 2018): utilizzare un metodo di stimolazione veramente selettivo per valutare le componenti precoci e intermedie corticali, ovvero la risposta verosimilmente della SI, tra 20 e 80 ms.

ii. Risultati e discussione

I: Femmina, 25 anni, dorso mano sinistra, tra primo e secondo osso metacarpale, IDE150 rigido 2x2cm, stimolazione a 1,6 mA, con soglia a 1,1 mA, 65,2 V, 43 Kohm con vaselina,

treno da 10 impulsi. Registrazione in C4'-Fz. Distanza area stimolata-SI stimata 710+200 mm.

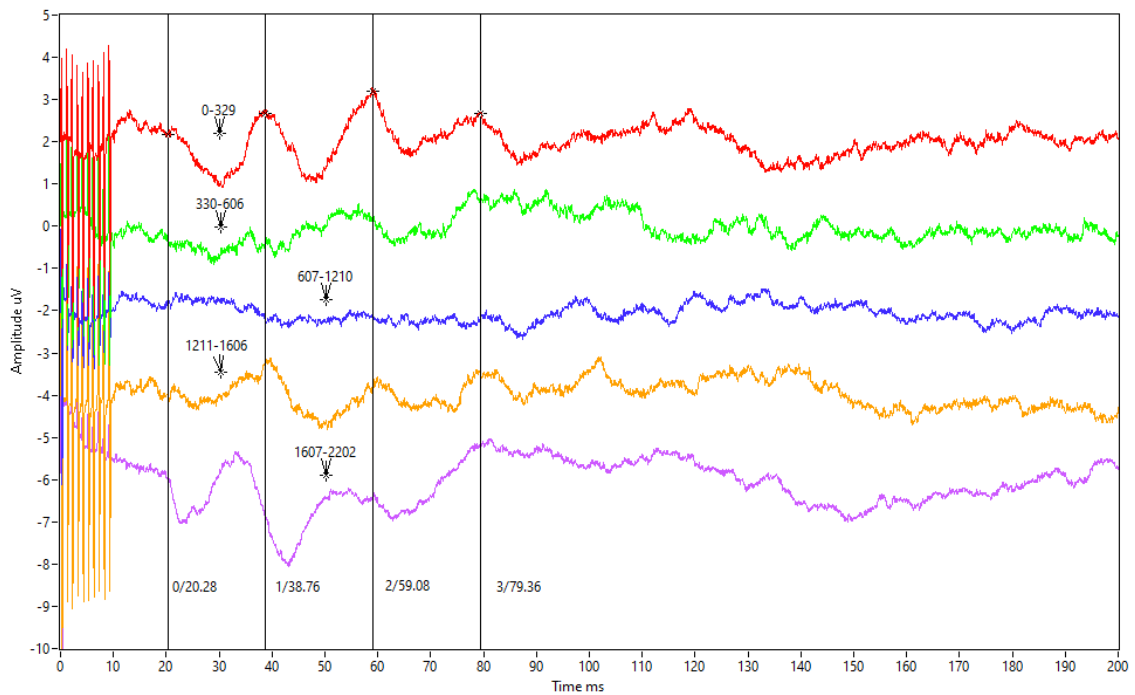


Figura 9. Gruppi di tracce con IDE: risposte da 0 a 329 (traccia rossa); da 330 a 606 (traccia verde); da 607 a 1210 (traccia blu); da 1211 a 1606 (traccia arancio); da 1607 a 2202 (traccia viola). Nella traccia rossa spiccano le tre onde N40, N60 e N1 (vedi testo).

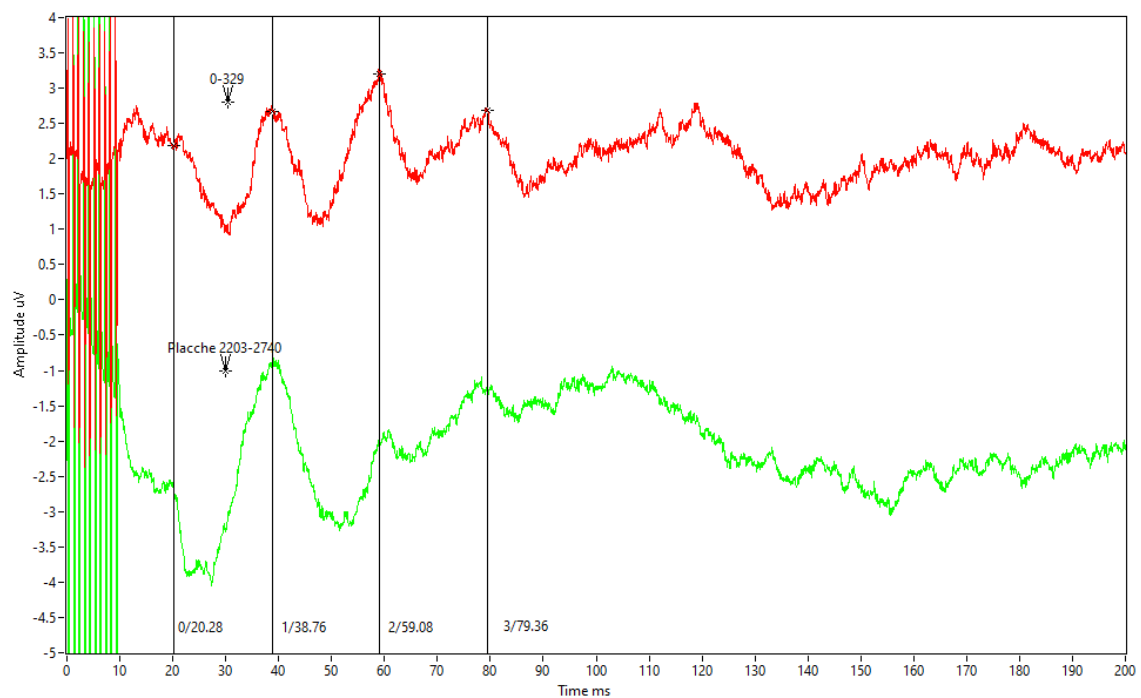


Figura 10. Tecniche di stimolazione a confronto: Gruppo di tracce con IDE da 0 a 329 risposte (traccia rossa); gruppo di tracce con placche da 2203 a 2740 (traccia verde). Si noti l'accentuazione di N40 e la importante riduzione di N60 e N1; inoltre, compare una N20.

Le placche autoadesive (fig. 10) sono poste nella stessa sede, 1 cm di distanza l'una dall'altra. La stimolazione è avvenuta a 6,4 mA, tensione 48,6 V e 60 Kohm di impedenza. Si sono potute raggiungere intensità maggiori perché la percezione, non più

puntoria, ma tattile lo consentiva. Così facendo si è potuta raggiungere una maggiore profondità di stimolo, assicurandosi l'attivazione delle A β .

Questa registrazione è la più datata e ottenuta con sito ed elettrodo differenti (4 cm² invece di 1) rispetto alle successive; inoltre il confronto non è avvenuto con elettrodi a coppette, ma con placche autoadesive da 0,5x1 cm.

Come in tutti i tracciati a seguire la finestra temporale considerata va da 0 a 200 ms. Il limite inferiore è dettato dalla necessità di mantenere l'artefatto da stimolazione che inevitabilmente annulla la possibilità di registrare eventuali risposte periferiche come analoghi di N5 e N9, ma è garanzia di genuinità dello stimolo. Il limite superiore costituisce una mediazione tra il bisogno di mantenere una ragionevole lunghezza per le varie onde e poter visualizzare eventuali risposte tardive, *event-related*.

Fig. 9: Le tracce riportate sono segnate coi limiti superiori delle risposte mediate per ottenerle. Sono circa 512 risposte per traccia. La ragione di quest'ultima è la necessità di risaltare le tre onde in serie che cadono a 38,76 ms, detta N40 per approssimazione, 59,08, detta N60, e 79,36, tempo riconducibile ad una N1 molto precoce. Il motivo della precocità di quest'ultima onda, evento-correlata a differenza delle altre due è riconducibile alla breve durata dello stimolo, solo 10 ms rispetto a quella di altre metodiche come il laser.

È fondamentale che queste risposte siano risaltate perché costituiscono quello che si pensa sia lo stereotipo delle risposte precoci e medie PREP, cioè l'elemento di confronto per tutte le altre registrazioni.

Calcolando la velocità di conduzione con la formula su descritta si ottengono: 23,31 m/s per la N40, 15,44 m/s per N60, 11,50 m/s per N1. In tutti e tre i casi si rientra pienamente nel range delle A δ .

Non ci sono prove per decidere se queste risposte derivino da multipli generatori corticali in SI e circondario o da un unico generatore attivato da pacchetti di fibre a diversa velocità di conduzione.

Importante notare, sempre nella prima traccia, la mancanza di significativa attività prima dei 35 ms, segno di una mancata attivazione A β , che è quanto ci si auspica per avere la dovuta selettività. Manca, inoltre, l'attività successiva a N1, anche perché N2/P2 sono risposte di vertice e li andrebbero registrate.

L'ampiezza delle onde è molto ridotta, solo 1-2 μ V. D'altronde l'area stimolata è piccola, e non si tratta di potenziali tardivi, *evento-related*, espressione dell'attivazione di una gran quantità di generatori sottocorticali, ma di potenziali precoci, reclutanti un numero molto minore di unità corticali.

Le tracce successive perdono questa evidenza probabilmente in relazione alla stanchezza del soggetto; infatti aumentavano gli artefatti muscolari. Si può pensare anche ad un affaticamento delle fibre, nonché ad un'alterazione del dielettrico. Rimangono tuttavia ben visibili nella terza traccia ancora tutte e tre le onde, circa due nella seconda e due nella quarta, seppur leggermente anticipate.

Fig. 10: Al confronto colle placche si notano fondamentalmente due variazioni:

-Nella traccia da placche compare una componente N20. Questo non comporta picco d'ampiezza da stimolazione del mediano. Questo era immaginabile data la stimolazione di una piccola area cutanea a confronto di un tronco nervoso e dato il fatto che lo stimolo sia costituito da un treno di 10 impulsi di cui solo il primo depolarizza le A β (Leandri et al. 2018).

-Mentre divengono non rilevanti la N60 e la N1, la N40 pare accentuarsi. Questo non dovrebbe stupire considerando che le placche sono una stimolazione aspecifica per le fibre A β , cioè stimolano potenzialmente anche le fibre piccole, se la loro soglia è raggiunta. Siccome però l'intensità di stimolazione ammonta a 6,4 mA e la stimolazione con IDE abbisognava di solo 1,1, è ragionevole pensare che anche le A δ ne siano state attivate.

La ragione per cui la N40 si esalta e le altre due onde scemino si può far risalire alla velocità di conduzione delle A δ . Se, infatti, si assume che il *gating* midollare sia una realtà per lo meno significativa, così come pare, potrebbe succedere questo: le fibre più veloci tra le A δ conducono ad una velocità praticamente sovrapponibile alle A β più lente, il che vuol dire che i loro segnali arrivano alle corna posteriori in concomitanza di una parte delle A β , riuscendo a sfuggire all'inibizione. Le A δ più lente, invece, all'arrivo al midollo troveranno le sinapsi iperpolarizzate dal precedente impulso A β e passeranno in numero minore o non passeranno del tutto. Così, mentre il primo fronte A δ si sommerà a quello A β lento potenziando il segnale, i successivi ne verranno inibiti e ridurranno l'onda risultante.

II: Femmina di 25 anni, stimolazione con IDE 150 1cm² rigido, tra I e II osso metacarpale della mano destra per cui registrazione in C3'-Fz; soglia 1,6 mA; stimolazione a 2,4 mA, tensione 42,6 V e impedenza 23 Kohm distanza sito stimolazione-SI: 760+200mm.

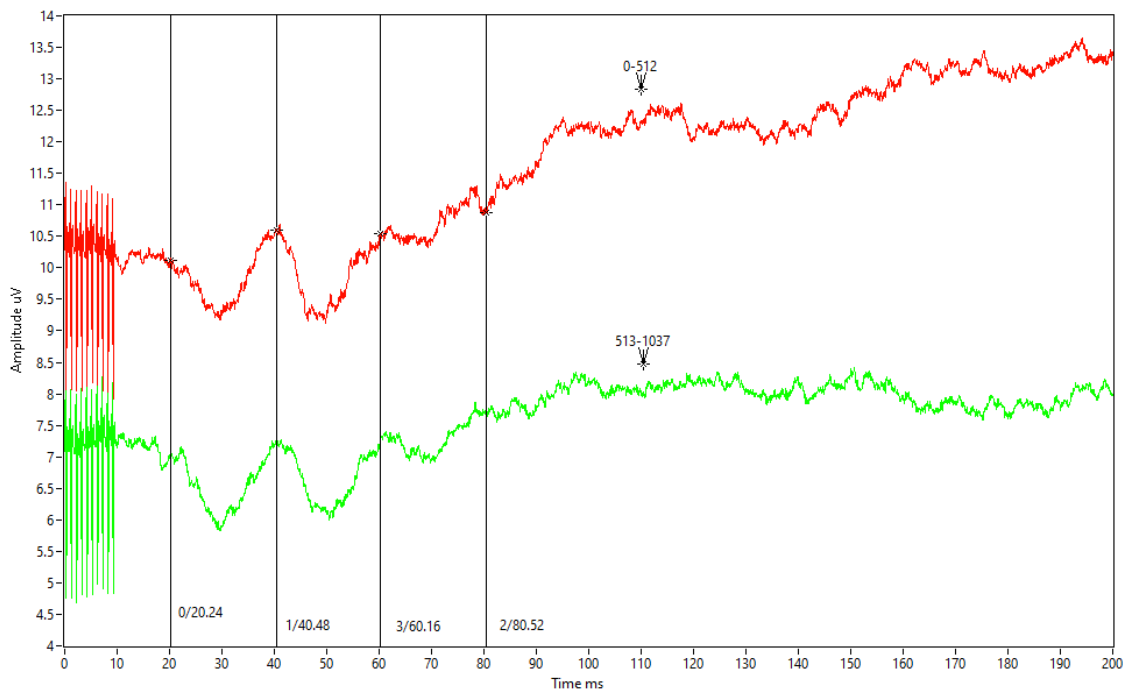


Figura 11. Gruppi di tracce con IDE: risposte da 0 a 512 (traccia rossa); dalla 513 alla 1037 (traccia verde). Sono visibili sia N40 che N60.

Lasciando invariato il resto, si sostituisce l'IDE con elettrodi a coppetta nella stessa sede.

I parametri per le due stimolazioni sono:

-Con treno da 10 impulsi: Soglia 5,0 mA, stimolo a 6,0, tensione 21,7 V e 4 Kohm.

-Con singolo impulso: Soglia 6,0 mA, stimolo a 7,5, tensione 27,9 V e 4 Kohm

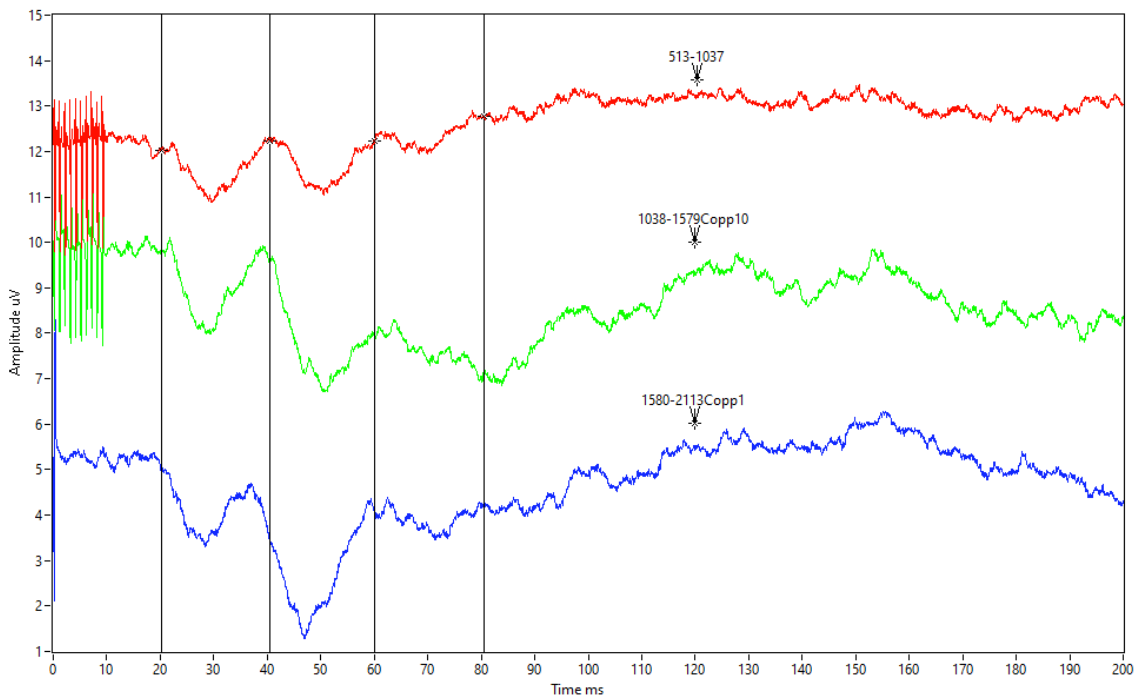


Figura 12. Tecniche di stimolazione a confronto: Gruppo di tracce con IDE da 513 a 1037 (traccia rossa); gruppi di tracce con elettrodi a coppetta da 1038 a 1579 con treno da 10 impulsi (traccia verde); da 1580 a 2113 con singolo impulso (traccia blu). Accentua N40, scompare N60, dato più evidente dopo stimolazione con un impulso, e compare N20.

In fig. 11 si trovano le due tracce ottenute con IDE a confronto. Paragonandole al prototipo su indicato entrambe presentano una evidente N40 e una meno evidente N60. N1 non compare.

La velocità calcolata risulta essere per N40 di 23,72 m/s, per N60 di 16,00 m/s, entrambi in range A δ . L'ampiezza si conferma tra 1 e 2 μ V.

In fig. 12: Nel confronto colle coppette è stato riportato il secondo gruppo di risposte da IDE per avere una maggiore definizione della N60. Con uno o 10 impulsi si ha comunque risalto della zona intorno a 20 ms, segno di attivazione A β . Inoltre, N1 non compare al venir meno dell'artefatto e N60 si abbozza solo nella versione a 10 stimoli, che è infatti più selettiva per le A δ . Il fatto che N40 compaia e anzi mostri ampiezza circa doppia rispetto a quella con IDE (3 μ V vs 1,5 μ V), non stupisce, ma conferma quanto già scritto. Infatti, il picco è massimo nella stimolazione a 10 impulsi, che recluta più A δ di quella a un ciclo, segno probabile, di nuovo, che N40 del secondo tracciato della fig. 12 sia espressione della somma delle afferenze tattili lente e dolorifiche veloci.

III: Femmina, 25 anni, stimolazione con IDE 150 1cm² rigido, di mano destra tra primo e secondo osso metacarpale, quindi registrazione in C3'-Fz; stimolazione a 1,0 mA, tensione 77,8 V, impedenza 81,0 kOhm. Distanza sito di stimolazione-SI 750mm+200mm.

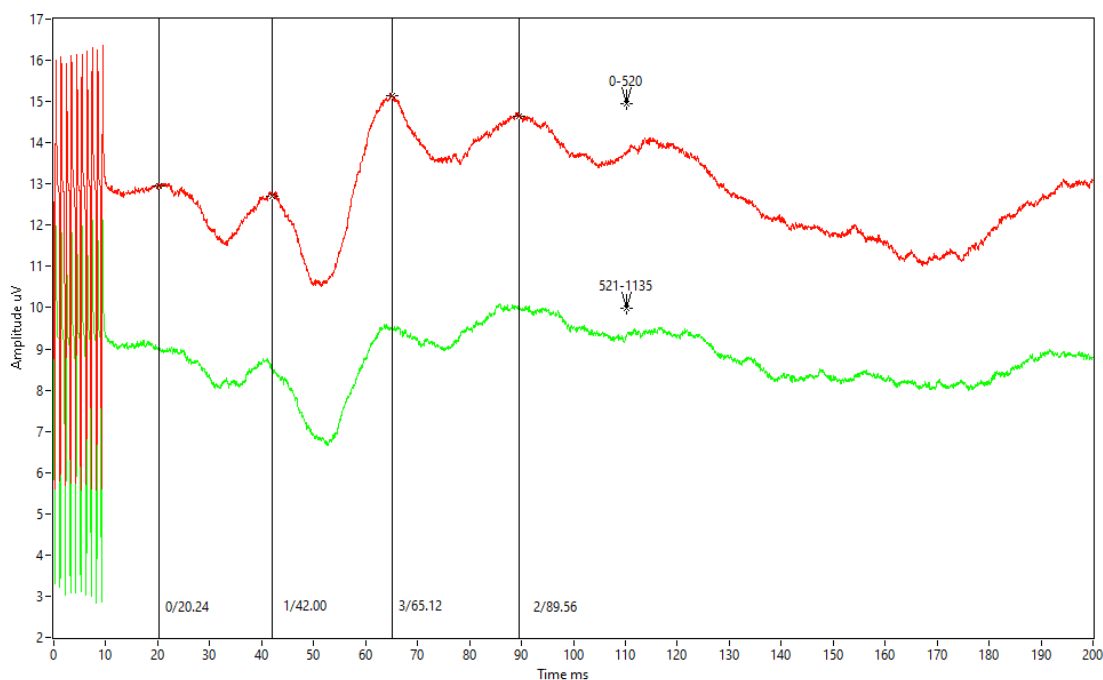


Figura 13. Gruppi di tracce con IDE: risposte da 0 a 520 (traccia rossa); da 521 a 1135 (traccia verde). Si distinguono bene le tre onde.

Con le coppette i parametri che si sono ottenuti sono i seguenti:

-Con dieci stimoli: Soglia 3,5 mA, stimolo a 5,0, tensione 21,7, impedenza 5,0 Kohm

-Con stimolo singolo: Soglia 4,8 mA, stimolo a 6,3, tensione 24,2 V, impedenza 4,0 Kohm

Fig. 13: Anche in questo caso è bene visibile una N40, 60 e 1. L'ampiezza delle onde è sui 2 μV , come tipico. La velocità calcolata per le onde del primo tracciato ammonta a 22,62 m/s per la N40, 14,59 per la N60 e 10,61 per la N1. Anche in questo caso in regola colle latenze attese. Non ci sono onde significative prima dei 35 ms, né dopo i 90.

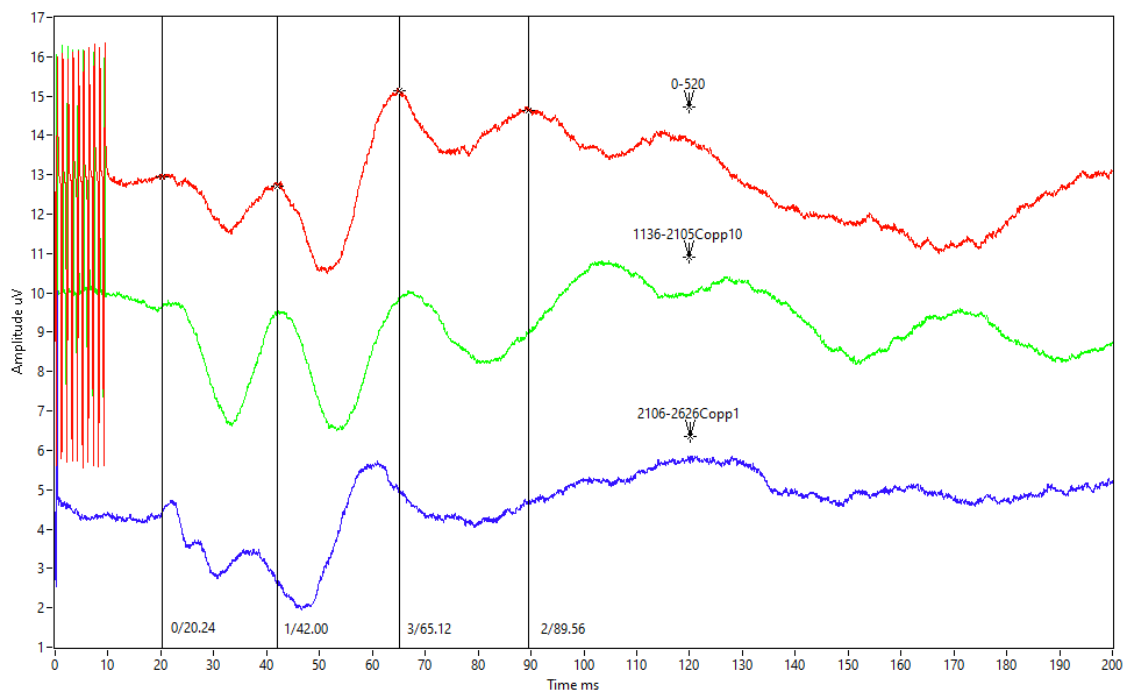


Figura 14. Tecniche di stimolazione a confronto: Gruppo di tracce con IDE da 0 a 520 (traccia rossa); gruppi di tracce con elettrodi a coppetta da 1136 a 2105 con treno da 10 impulsi (traccia verde); da 2106 a 2626 con singolo impulso (traccia blu). Si noti la differenza tra treno e singolo impulso.

In fig. 14 nelle coppette compare anche la N60 che circa si mantiene, ma la N1 scompare. Positivo è che si evidenziano bene le N20 con coppette, soprattutto per lo stimolo singolo e che la N40 aumenti in coppette a 10 stimoli, ma si riduca in quella a 1 stimolo.

IV: Femmina, 55 anni, IDE150, 1 cm^2 rigido, mano destra tra I e II osso metacarpale, quindi registrazione a C3'-Fz, distanza tra sito di stimolazione e SI di 770mm+200mm. La soglia era 1,9 mA, la stimolazione è avvenuta a 3,0 mA, tensione 91,3 V, impedenza 57,0 Kohm.

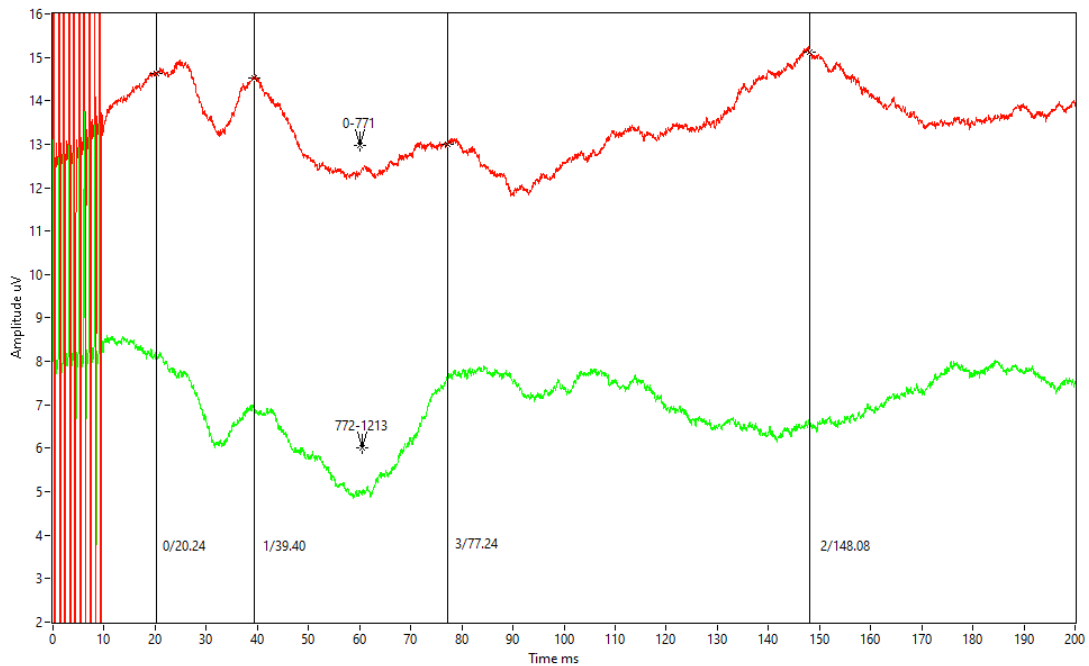


Figura 15. Gruppi di tracce con IDE: risposte da 0 a 771 (traccia rossa); da 772 a 1213 (traccia verde). Presente N40; accennata N1. L'attività a 148 ms del primo tracciato non si ripete.

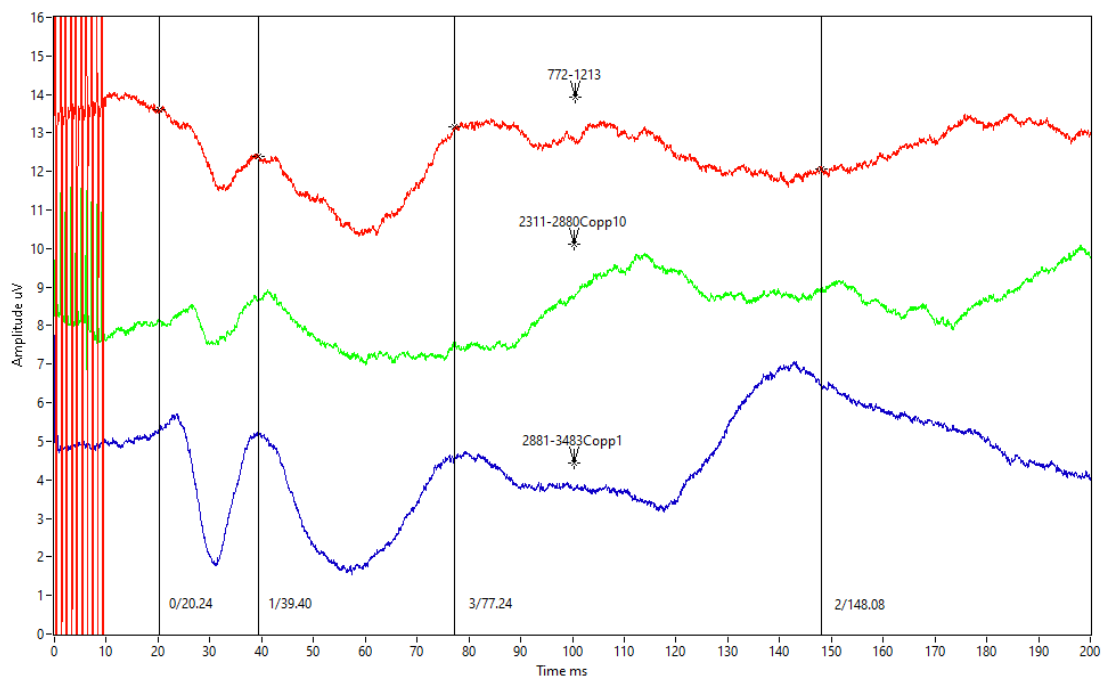


Figura 16. Tecniche di stimolazione a confronto: Gruppo di tracce con IDE da 772 a 1213 (Traccia rossa). Gruppi di tracce con elettrodi a coppetta da 2311 a 2880 con treno da 10 impulsi (traccia verde); da 2881 a 3483 con singolo impulso (traccia blu). Risalta N20 nelle tracce verde e blu, accentua N40 come previsto; N60 ricompare in traccia blu.

Le coppette prevedono questi valori:

-Con 10 impulsi: soglia 1,1 mA, stimolo a 1,5 mA, tensione 20,4 V, impedenza 13,0 Kohm.

-Con singolo impulso: soglia 1,9 mA, stimolo a 3,0 mA, tensione 25,4, impedenza 9,0 Kohm

Fig. 15: Non si può ignorare che la prima onda sia stata inquinata da una componente precoce realisticamente riconducibile ad attività A β . Tuttavia, il secondo gruppo di onde non presenta questo problema, essendo che si è operato per riposizionare l'elettrodo. Il secondo, infatti, riduce l'ampiezza dell'onda N40, come che prima esistesse una componente A β aggiuntiva; mentre aumenta l'ampiezza della N1, che, infatti, stando a quanto ipotizzato, sarebbe una componente β -soppressa. Non c'è componente N60, né attività prima dei 35 ms o dopo i 90 ms in questo secondo tracciato.

Le velocità stimate di conduzione per queste seconde onde risultano 24,62 m/s per la N40 e 12,56 m/s per la N1.

Nel confronto colle coppette (fig. 16) bene si vede risaltare la N20, e meglio per la stimolazione a 1 impulso. Anomalo è che la N40 risalti nella stimolazione a singolo impulso rispetto che in quella con treno da dieci, inoltre sempre nell'ultimo tracciato compare un'onda simile alla N1.

Maschio, 25 anni, stimolazione con IDE150 1 cm² rigido del dorso della mano destra, quindi registrazione in C3'-Fz. Intensità dello stimolo a soglia 1,5 mA, stimolazione a 2,0 mA, tensione 56,9 V, impedenza 43,0 Kohm. Distanza punto di stimolazione- SI 790+200 mm.

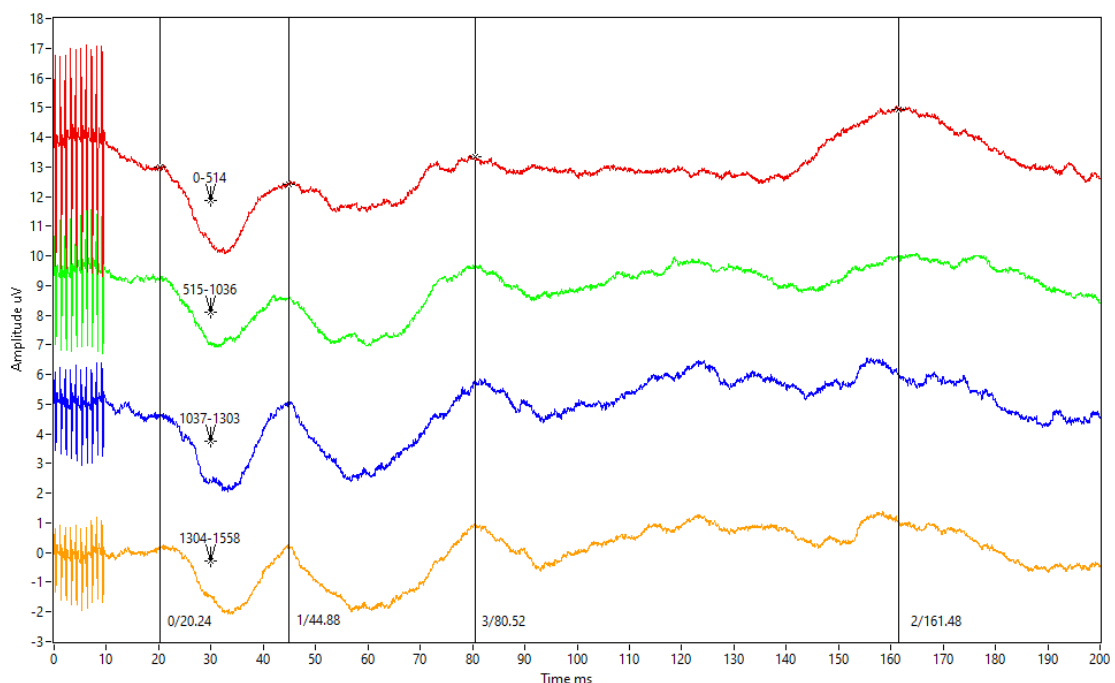


Figura 17. Gruppi di tracce con IDE: risposte da 0 a 514 (traccia rossa); da 515 a 1036 (traccia verde); da 1037 a 1303 (traccia blu); da 1304 a 1558 (traccia arancio). Si vedono N40 e N60.

Nella stimolazione con elettrodi a coppetta i valori erano:

-Con 10 impulsi: intensità di stimolazione 3,0 mA, tensione 16,6 V, impedenza 6,0 Kohm

-Con singolo impulso: intensità di stimolazione 4,2 mA, tensione 192 V, impedenza 5,0 Kohm

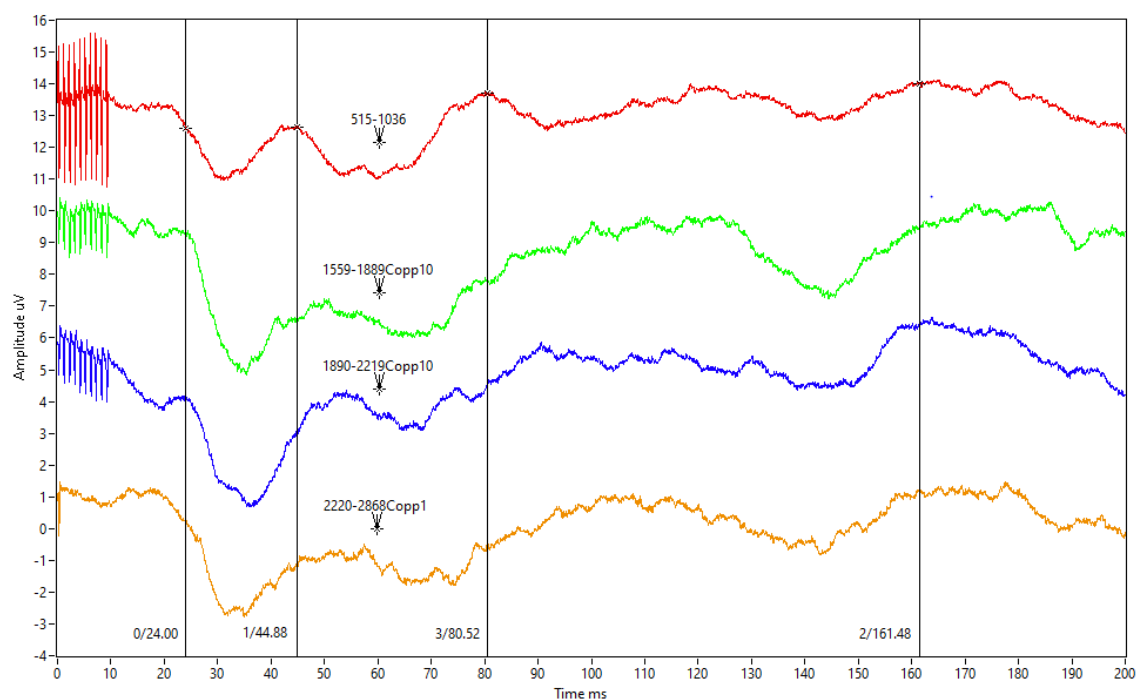


Figura 18. Tecniche di stimolazione a confronto: Gruppo di tracce con IDE da 515 a 1036 (traccia rossa); gruppi di tracce dopo stimolazione con elettrodi a coppetta da 1559 a 1889 (traccia verde) e 1890 a 2219 (traccia blu) con treno da 10 impulsi; da 2220 a 2868 con singolo impulso. N20 compare; N40 in questo caso tende a scemare; N60 scompare.

Si tratta di una lunga registrazione sia con IDE che con coppette. Questo rafforza la significatività dei dati. Nella fig. 17 si vede progressivamente meglio la N40 e meglio la N1, mentre non ci sono N60 evidenziabili. Non ci sono onde prima dei 35 ms e non oltre i 90, a eccezione di un'onda a 161,48 ms che però non si ripete nelle stimolazioni successive. Le onde hanno ampiezza di massimo 3 μ V.

La velocità stimata è per N40 22,06 m/s e per N1 12,30 m/s.

Nel confronto colle coppette in fig. 18 bene risalta la N20 nel secondo emittracciato ottenuto con treno da 10 impulsi. Molto evidente la perdita totale di N1 e la notevole riduzione dell'ampiezza di N40, che, come prospettabile, tocca il minimo d'ampiezza nel gruppo di risposte dopo singolo impulso.

Rispetto a due lavori precedentemente pubblicati sull'argomento, questo studio indaga parti differenti del tracciato elettroencefalografico: le componenti precoci e medie per latenza, non le tardive. Questo pone una questione rispetto alla sovrapponibilità dei dati tra gli studi. Infatti, le nostre registrazioni sono state realizzate con un montaggio a soli

due elettrodi, capaci di esplorare solo una componente tardiva, la N1, presunta espressione della attività di SII.

Di contro, il ridotto interesse dei due studi precedenti nei confronti delle onde medio-precoci ha portato gli autori a focalizzare i tracciati sulla finestra dei potenziali *event-related* con conseguente perdita di focus su potenziali precoci, riducendo la possibilità di confronto coi presenti dati.

Pertanto, l'unico vero paragone utilizzabile in questo che è di fatto un campo inesplorato sono i tracciati stessi della tesi. Per una vista più generale sono stati riuniti in un singolo grafico i gruppi di tracce più rappresentativi, con i tracciati dei soggetti organizzati nell'ordine in cui sono stati precedentemente esposti, in fig. 19:

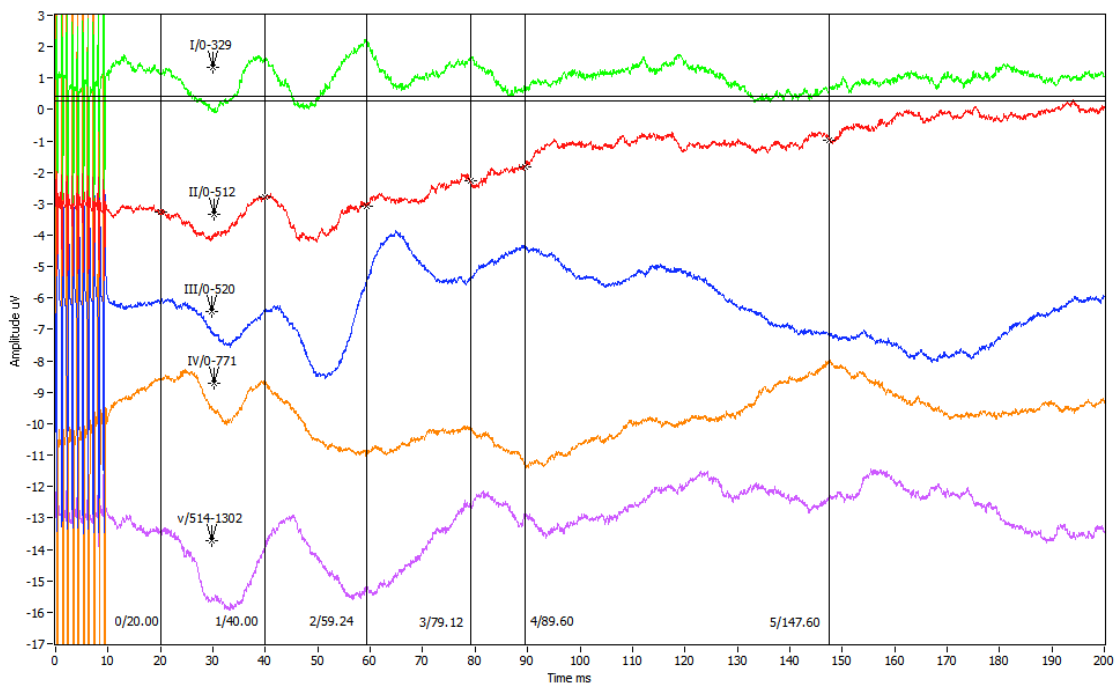


Figura 19. Confronto tra i più significativi gruppi di tracce tra i 5 soggetti; in ordine dall'alto al basso dal primo all'ultimo come sono stati presentati nel testo in precedenza (primo verde, secondo rosso, terzo blu, quarto arancio, quinto viola). Si nota che le tre onde, ben evidenti per il primo volontario, si ripetono, anche se non sempre tutte assieme, di tracciato in tracciato.

Il tracciato prototipico iniziale è cosiddetto per il semplice fatto che le onde di cui è composto non sono mai state descritte prima e tutte, anche se non sempre assieme e non sempre con la stessa latenza, ricorrono. Sulla base di questi dati unici nel loro genere, si può parlare di tre onde negative di latenza media 41,20 ms (N40), 61,95 ms (N60), 81,47 ms (N1). L'onda più frequente è la N40, presente in tutti i tracciati, seconda la N1 (4/5), ultima la N60 (3/5). Le ampiezze variano da 1 a 3 μ V.

In realtà alcuni confronti con gli altri studi sono possibili. Si tratta di supposizioni, perché gli autori non vi si erano soffermati, non essendo di loro interesse la parte più precoce del

tracciato; tuttavia, rivedendoli in questa chiave di lettura, alcune componenti possono essere evidenziate.

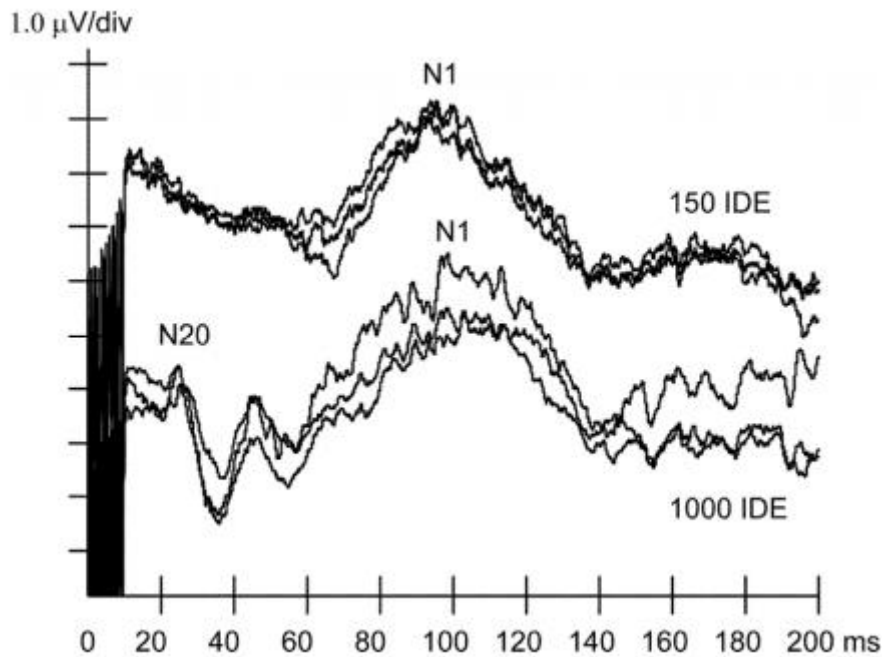


Figura 20. Tracciato di confronto IDE150 (in alto) con IDE1000 (in basso). Si noti per quest'ultimo la comparsa di una probabile N40 già accennata nel primo tracciato.

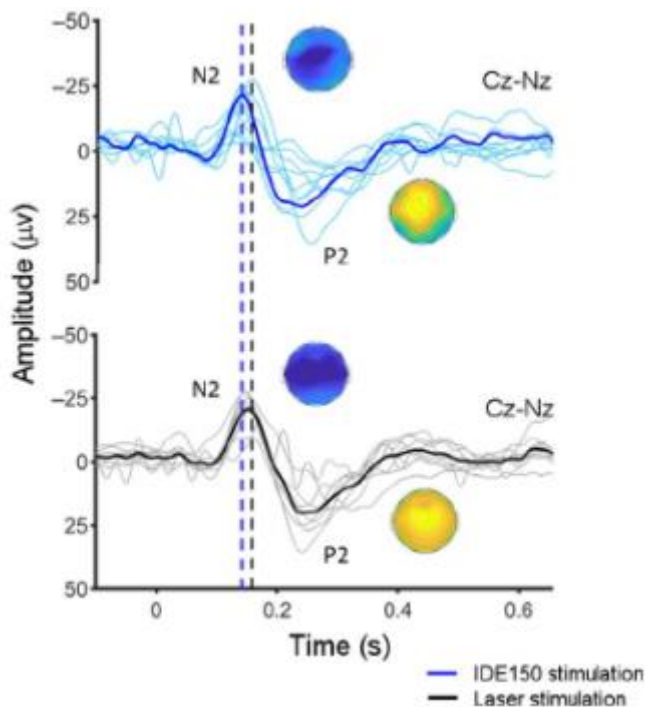


Figura 21. Tracciato di confronto IDE150 e Nd:YAP. Si noti in quest'ultimo abbozzarsi una probabile N40, meno marcata ma forse pure presente nel tracciato superiore.

Il tracciato in fig. 20, preso dal lavoro di presentazione dell'elettrodo (Leandri et al. 2018), riporta un confronto tra la stimolazione con 1000 IDE, abbandonato, e 150 IDE stimolando con il treno di impulsi che anche in questo lavoro si è utilizzato. Attorno ai 50 ms cade una negatività che, solo abbozzata con IDE 150, è bene evidente con quello da

mille. Questa differenza tra elettrodi è di certo inattesa e anzi paradossale, ma non si spiega chiaramente. Tuttavia, si può con sicurezza affermare che non si tratti di A β . Infatti, il potenziale è davvero troppo lento per essere ascritto alla attività di tali fibre, ma al contempo troppo veloce per essere *event-related*.

Il secondo tracciato (fig. 21) è estrapolato dal lavoro di Di Stefano et al. del 2020 e valuta, in questa specifica rappresentazione grafica, i PREP da stimolazione periorale con IDE, confrontandoli con laser Nd:YAP, che, si ricorda, non è del tutto selettivo.

Il tracciato è ripreso a campo assai largo e questo rende difficile leggere le componenti a bassa ampiezza e breve latenza. Ma se si aguzza lo sguardo sul primo gruppo di tracce, che riporta i risultati da stimolazione con IDE, si può notare una piccola deflessione negativa prima di N2. La scala non aiuta, ma ci si immagina che l'onda cada attorno ai 30 ms.

Considerando che la via nervosa dalla regione periorale è più breve di quella da mano, ne risulta un'onda attesa più precoce rispetto a N40. Quest'onda non pare casuale, infatti, oltre a ripetersi tra più soggetti la cui media risulta in quanto esposto, si ripete anche con stimolazione laser. Come LEP pare avere latenza e ampiezza maggiore. Ciò appare ragionevole tenendo conto che:

-Per la parte dell'ampiezza, si può riportare quanto già ipotizzato nel lavoro del 2018, cioè che gli stimoli IDE, a frequenza assai più rapida e ampiezza più costante dei LEP, sono a parità di latenza e significato, meno ampi.

-Per la parte della latenza, gli autori riportano, in riferimento a N2/P2 tra i due tracciati, che la differenza non sia statisticamente significativa, e che, comunque, qualora anche la fosse, sarebbe semplicemente assimilabile alla diversa modalità di stimolazione da parte dei due dispositivi.

Un'altra questione ancora in sospeso è quella delle fibre C.

Nei tracciati registrati per questa tesi la finestra utilizzata non raggiunge l'ampiezza necessaria per intercettare le eventuali risposte. Infatti, la loro massima velocità si aggira sui 2 m/s, che per la lunghezza minima presentata, 910 mm comporterebbe onde sui 455 ms, oltre il limite dell'asse dei tempi che si è usato in registrazione, massimo di 400. È necessario quindi rimandare queste valutazioni ad un approfondimento dedicato.

Conclusioni

Tempo è passato da quando Hans Berger nel 1926 ideò l'elettroencefalogramma. Da quel momento la ricerca neurofisiologica è stata un susseguirsi di studi per scremare sempre più quel vago affastellamento di onde corticali e ricavarvi qualcosa di interpretabile, utile a curare le persone.

Si spera che anche questo lavoro possa aggiungere un tassello all'immenso mosaico dell'interpretazione delle risposte corticali evocate e che ne possa derivare una migliore comprensione della fisiopatologia delle fibre A δ .

Campi di applicazione in questo senso non mancherebbero all'IDE150. Un esempio principe tra tutte le patologie che attendono di essere studiate è la neuropatia diabetica. Essa è la prima causa di neuropatia nel mondo occidentale, non ha cura o rimedio specifico, se non la prevenzione del danno neurologico controllando la malattia metabolica sottostante.

In questa patologia le fibre più colpite e precocemente sono proprio le A δ . Questo a

discapito della ben nota alterazione clinica più precoce, l'ipo-apallestesia (Alsunousi e Marris 2014).

Tuttavia, la riduzione della concentrazione delle A δ per unità di epidermide, anche se non facilmente rilevabile all'esame neurologico, potrebbe essere colta dall'IDE, i cui PREPs risulterebbero ridotti di ampiezza prima che il deficit pallestesico si renda manifesto. I potenziali IDE potrebbero, quindi, comportare un intervento precocissimo sui fattori di rischio o addirittura influenzare il precoce inizio di terapia in un futuro in cui, si spera, nuovi farmaci saranno a

Table 2 LEP studies in diseases of the central nervous system.

Diseases of central nervous system	
Syringomyelia	Kakigi et al., 1991 [28] Treede et al., 1991 [48] Hatem et al., 2010 [24]
Multiple sclerosis	Kakigi et al., 1992 [26] Spiegel et al., 2003 [41]
Vascular lesions	Hansen et al., 1996 [42] Urban et al., 1999 [54] Veciana et al., 2005 [57] Montes et al., 2005 [33] Greenspan et al., 1999 [23] Garcia-Larrea et al., 2010 [19]
Migraine	de Tommaso et al., 2002 [18] Valeriani et al., 2003 [56] de Tommaso et al., 2003 [17] de Tommaso et al., 2009 [15]
Fibromyalgia	Gibson et al., 1994 [21] Granot et al., 2001 [22] de Tommaso et al., 2011 [13] Lorenz et al., 1996 [32]
Miscellaneous	Tinazzi et al., 2008 [45] Tinazzi et al., 2010 [44] De Tommaso et al., 2011 [14] Simone et al., 2010 [40]

Tabella 3. Patologie centrali di cui si sono studiati i LEPs.

disposizione per trattare specificamente questa condizione, che affligge centinaia di migliaia di persone in tutto il mondo.

Insieme alla neuropatia diabetica ogni neuropatia dolorosa, di fatto, può essere indagata con l'IDE; così come ogni danno lungo le vie sensoriali deputate alla trasmissione del dolore può essere studiato attraverso questa metodica. Le basi per tale obiettivo sono già state gettate da Di Stefano et al. nel 2020 con le loro prove su tre pazienti patologici di cui si è parlato in precedenza; solo tre soggetti, ma con lesioni a diverso livello affatto specifiche e rappresentative.

Anche se è necessaria molta più sperimentazione per far sì che l'elettrodo ottenga indicazione allo studio delle varie patologie delle vie del dolore, è immaginabile che questi risultati in molta parte arriveranno, se

l'elettrodo ha davvero la selettività dimostrata, almeno in quegli ambiti in cui il suo predecessore, il laser, già ha trovato applicazione e convalida.

Nelle tabelle 3 e 4 (Valeriani et al. 2012) sono riportate le patologie centrali (tab. 3) e periferiche (tab. 4) che sono state studiate con i LEPs. I risultati dimostrano come la stimolazione selettiva delle fibre A δ porti un significativo vantaggio in alcuni contesti. Ad esempio, i PREPs si sono rivelati molto sensibili nel rilevamento di piccole lesioni ischemiche che interrompono le vie deputate alla nocicezione, hanno portato soluzione all'annoso problema degli artefatti muscolari in seguito a stimolazione delle aree trigeminali, che, in precedenza, rendevano difficile uno studio di questi territori senza curarizzazione, così come hanno permesso di studiare casi di mononeuropatia dolorosa (post-erpetica, per esempio), e, ancora, hanno mostrato alterazioni non rilevabili con i SEPs in corso di siringomielia o di certe neuropatie delle piccole fibre, quali l'amiloidosi (Cruccu et al. 2008); inoltre, sono stati studiati disturbi dalla patogenesi ancora non del tutto nota, come emicrania e fibromialgia.

È dell'IDE l'audace proposito di rimpiazzare man mano in ognuna di queste indicazioni la precedente tecnica dei potenziali laser-evocati, non solo da un punto di vista pratico, ma anche nella possibilità di affrancarsi dai potenziali evento-correlati, aprendo la strada all'interpretazione dei nuovi potenziali evocati precoci ed intermedi.

Peripheral neuropathies	
Trigeminal neuralgia/trigeminal neuropathy	Cruccu et al., 2001 [12]
	Cruccu et al., 2003 [11]
Carpal tunnel syndrome	Arendt-Nielsen et al., 1991 [3] de Tommaso et al., 2009 [15] Truini et al., 2009 [50]
Postherpetic neuralgia	Truini et al., 2003 [53] Truini et al., 2008 [51]
Diabetes	Agostino et al., 2000 [1] Pozzessere et al., 2002 [37]
Polyneuropathy	Truini et al., 2010 [49] Casanova-Molla et al., 2011 [7] Pazzaglia et al., 2010 [35]
Radiculopathy	Lorenz et al., 1996 [31] Quante et al., 2007 [39] Quante et al., 2010 [38]
Fabry's disease	Valeriani et al., 2004 [55]
Miscellaneous	Kakigi et al., 1991 [27]

Tabella 4. Patologie periferiche di cui si sono studiati i LEPs.

Bibliografia

- 1) Alsunousi, Salma, e Husnia I. Marrif. «Diabetic Neuropathy and the Sensory Apparatus “Meissner Corpuscle and Merkel Cells”». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (2014): 79. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00079>.
- 2) Bastuji, Hélène, Maud Frot, Caroline Perchet, Michel Magnin, e Luis Garcia- Larrea. «Pain Networks from the inside: Spatiotemporal Analysis of Brain Responses Leading from Nociception to Conscious Perception». *Human Brain Mapping* 37, n. 12 (2016): 4301–15. <https://doi.org/10.1002/hbm.23310>.
- 3) Baumgärtner, U., W. Greffrath, e R.-D. Treede. «Contact Heat and Cold, Mechanical, Electrical and Chemical Stimuli to Elicit Small Fiber-Evoked Potentials: Merits and Limitations for Basic Science and Clinical Use». *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology* 42, n. 5 (ottobre 2012): 267–80. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2012.06.002>.
- 4) Bromm, B., e W. Meier. «The Intracutaneous Stimulus: A New Pain Model for Algesimetric Studies». *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 6, n. 7 (luglio 1984): 405–10.
- 5) Buijs, Tamara Jo elle, e Peter Anthony McNaughton. «The Role of Cold-Sensitive Ion Channels in Peripheral Thermosensation». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 (20 agosto 2020). <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00262>.
- 6) Carr, Daniel B., Srinivasa N. Raja, Milton Cohen, Nanna B. Finnerup, Herta Flor, Stephen Gibson, Francis J. Keefe, et al. «The Revised International Association for the Study of Pain Definition of Pain: Concepts, Challenges, and Compromises». *PAIN* 161, n. 9 (settembre 2020): 1976–82. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
- 7) Cesare, Paolo, e Peter McNaughton. «Peripheral Pain Mechanisms». *Current Opinion in Neurobiology* 7, n. 4 (1 agosto 1997): 493–99. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80028-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80028-1).
- 8) Crawford, LaTasha K., e Michael J. Caterina. «Functional Anatomy of the Sensory Nervous System: Updates From the Neuroscience Bench». *Toxicologic Pathology* 48, n. 1 (gennaio 2020): 174–89. <https://doi.org/10.1177/0192623319869011>.
- 9) Cruccu, G., M. J. Aminoff, G. Curio, J. M. Guerit, R. Kakigi, F. Mauguier, P. M. Rossini, R.-D. Treede, e L. Garcia-Larrea. «Recommendations for the Clinical Use of Somatosensory-Evoked Potentials». *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119, n. 8 (agosto 2008): 1705–19. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.03.016>.
- 10) Di Stefano, Giulia, Andrea Di Leonardo, Silvia La Cesa, Giuseppe Di Pietro, Alessandra Fasolino, Eleonora Galosi, Caterina Leone, et al. «The New Micropatterned Interdigitated Electrode for Selective Assessment of the Nociceptive System».

European Journal of Pain (London, England) 24, n. 5 (maggio 2020): 956–66.
<https://doi.org/10.1002/ejp.1545>.

- 11) Dowman, R., e S. Schell. «The Pain-Related Negative Difference Potential: A Direct Measure of Central Pain Pathway Activity or of Interactions between the Innocuous Somatosensory and Pain Pathways?» *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 29, n. 5 (1 ottobre 1999): 423–42. [https://doi.org/10.1016/S0987-7053\(00\)87266-4](https://doi.org/10.1016/S0987-7053(00)87266-4).
- 12) Garcia-Larrea, Luis. «Chapter 30 Evoked Potentials in the Assessment of Pain». In *Handbook of Clinical Neurology*, 81:439–XI. Elsevier, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(06\)80034-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(06)80034-5).
- 13) Helfrich, Randolph F., e Robert T. Knight. «Cognitive Neurophysiology: Event-Related Potentials». In *Handbook of Clinical Neurology*, 160:543–58. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00036-9>.
- 14) «Cognitive Neurophysiology: Event-Related Potentials». *Handbook of Clinical Neurology* 160 (2019): 543–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00036-9>.
- 15) Inui, Koji, Tuan Diep Tran, Minoru Hoshiyama, e Ryusuke Kakigi. «Preferential Stimulation of Ad Fibers by Intra-Epidermal Needle Electrode in Humans», 2002, 6.
- 16) Katsarava, Zaza, Ilya Ayzenberg, Florian Sack, Volker Limmroth, Hans-Christoph Diener, e Holger Kaube. «A Novel Method of Eliciting Pain-Related Potentials by Transcutaneous Electrical Stimulation». *Headache: The Journal of Head and Face Pain* 46, n. 10 (novembre 2006): 1511–17. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2006.00446.x>.
- 17) M. Leandri, S. Leandri, e G. Lunardi. «Effect of Temperature on Sensory and Motor Conduction of the Rat Tail Nerves». *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology* 38, n. 5 (ottobre 2008): 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2008.08.002>.
- 18) Leandri, Massimo, Lucio Marinelli, Antonio Siri, e Luca Pellegrino. «Micropatterned Surface Electrode for Massive Selective Stimulation of Intraepidermal Nociceptive Fibres». *Journal of Neuroscience Methods* 293 (gennaio 2018): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.08.032>.
- 19) Lefaucheur, Jean-Pascal. «Clinical Neurophysiology of Pain». In *Handbook of Clinical Neurology*, 161:121–48. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64142-7.00045-X>.
- 20) Murthy, Swetha E., Meaghan C. Loud, Ihab Daou, Kara L. Marshall, Frederick Schwaller, Johannes Kühnemund, Allain G. Francisco, et al. «The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice». *Science translational medicine* 10, n. 462 (10 ottobre 2018). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9897>.

- 21) Muzyka, Iryna M., e Bachir Estephan. «Somatosensory Evoked Potentials». In *Handbook of Clinical Neurology*, 160:523–40. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00035-7>.
- 22) Nolano, Maria, Vincenzo Provitera, Giuseppe Caporaso, Annamaria Stancanelli, Massimo Leandri, Antonella Biasiotta, Giorgio Cruccu, Lucio Santoro, e Andrea Truini. «Cutaneous Innervation of the Human Face as Assessed by Skin Biopsy». *Journal of Anatomy* 222, n. 2 (febbraio 2013): 161–69. <https://doi.org/10.1111/joa.12001>.
- 23) Seifert, C. L., D. Nitzsche, M. Valet, T. R. Tölle, e T. Sprenger. «[Contact heat evoked potentials for the evaluation of pain pathways]». *Der Nervenarzt* 79, n. 8 (agosto 2008): 899, 902–7. <https://doi.org/10.1007/s00115-008-2465-7>.
- 24) Sneddon, Lynne U. «Comparative Physiology of Nociception and Pain». *Physiology* 33, n. 1 (1 gennaio 2018): 63–73. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2017>.
- 25) Treede, Rolf-Detlef, Jürgen Lorenz, e Ulf Baumgärtner. «Clinical Usefulness of Laser-Evoked Potentials». *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology* 33, n. 6 (dicembre 2003): 303–14. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2003.10.009>.
- 26) Valeriani, M., C. Pazzaglia, G. Cruccu, e A. Truini. «Clinical Usefulness of Laser Evoked Potentials». *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 42, n. 5 (ottobre 2012): 345–53. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2012.05.002>.
- 27) Vandewauw, Ine, Katrien De Clercq, Marie Mulier, Katharina Held, Silvia Pinto, Nele Van Ranst, Andrei Segal, et al. «A TRP Channel Trio Mediates Acute Noxious Heat Sensing». *Nature* 555, n. 7698 (marzo 2018): 662–66. <https://doi.org/10.1038/nature26137>.
- 28) Daube, Jasper R., e Devon I. Rubin, a c. di Clinical Neurophysiology. 3rd ed. Contemporary Neurology Series 75. New York: Oxford University Press, 2009.
- 29) Seitun, Andrea, a c. di Neurologia di Fazio-Loeb, quinta ed. Roma: Società Editrice Universo, 2019.
- 30) Kandel, Eric R., Schwartz, James H., Jessel, Thomas M., Siegelbaum, Steven A., Hudspeth A.S., a c. di Principi di neuroscienze, Quarta ed. italiana sulla quinta ed. inglese. Rozzano: Casa Editrice Ambrosiana, 2014.

Sitografia

- 1) https://it.wikipedia.org/wiki/Principio_di_indeterminazione_tonale

Ringraziamenti

