



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Medico-Veterinarie

Ciclo XXIX

Settore Scientifico Disciplinare VET08-Clinica Medica Veterinaria

IMPIEGO DELL'ELETTROENCEFALOGRAFIA (EEG)  
NELLO STUDIO DELLE FASI INTERITTALI  
DELL'EPILESSIA CANINA

USE OF ELECTROENCEPHALOGRAPHY (EEG) TO  
STUDY INTERCRITICAL PERIOD OF CANINE EPILEPSY

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

Tutor:  
Chiar.mo Prof. Maurizio Dondi

Dottorando: Fabio Biaggi

# INDICE

ABSTRACT.....	01
---------------	----

INTRODUZIONE.....	02
-------------------	----

## 1. EPILESSIA

1.1 Definizione.....	04
1.2 Cenni storici sull'epilessia.....	05
1.3 Fisiopatologia e patogenesi dell'epilessia.....	12
1.4 Classificazione delle crisi epilettiche.....	17

## 2. ELETTROENCEFALOGRAFIA (EEG)

2.1 Evoluzione storica dell'EEG.....	23
2.2 Cenni di anatomia e fisiologia del Sistema Nervoso Centrale.....	29
2.3 Neurofisiologia dell'attività elettrica cerebrale.....	36
2.4 Origine delle onde cerebrali.....	44
2.5 Posizionamento degli elettrodi: SI 10-20.....	45
2.6 Derivazioni e montaggi.....	50
2.7 Semeiologia EEG di base.....	54
2.8 Artefatti.....	59
2.9 Classificazione elettro-clinica delle crisi epilettiche.....	66

## 3. RISONANZA MAGNETICA (RM)

3.1 Introduzione e principi.....	71
3.2 Sequenze.....	72
3.3 Sequenze convenzionali.....	72
3.4 Sequenze rapide.....	76
3.5 Sequenze ultrarapide.....	78

#### **4. MATERIALI E METODI**

<b>4.1 Tipo di studio.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2 Obiettivo dello studio.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3 Disegno dello studio.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4 Criteri di inclusione ed esclusione.....</b>	<b>79</b>
<b>4.5 Animali.....</b>	<b>80</b>
<b>4.6 Metodi dei test.....</b>	<b>81</b>
<b>4.7 Risultati.....</b>	<b>85</b>
<b>4.8 Stima di accuratezza diagnostica.....</b>	<b>86</b>
<b>4.9 Discussione.....</b>	<b>88</b>

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>89</b>
--------------------------	-----------

## **ABSTRACT**

Electroencephalography (EEG) is a functional test that studies the spontaneous electromagnetic potential field of brain as a wave pattern. Currently, EEG in the diagnostic protocol for the Canine Idiopathic Epilepsy is considered as additional or add-on test. This means that as a third level test must be performed after magnetic resonance imaging (MRI) and cerebrospinal fluid (CSF) examinations, as indicated in "International Veterinary Task Force Consensus Proposal: diagnostic approach for epilepsy in dogs" (De Risio, 2015).

The aim of this work is to evaluate the diagnostic accuracy of the EEG test carried out in the inter ictal period of canine idiopathic epilepsy. For this objective we analyzed EEG, MRI and LCR data collected on a sample of 152 dogs with epilepsy. Based on the results we calculated: predictive positive index (IPP) and predictive negative index (IPN), sensitivity (SB) and specificity (SP) of EEG.

The values of these indices for the idiopathic epilepsy in dogs were: IPP = 0,84; IPN = 0,95; SB = 0,88; SP = 0,94. These results underline a very high sensitivity of EEG to correctly diagnose 88% of real idiopathic epilepsy dog. Furthermore, the very significant value of the predictive negative index indicates that 91% of animals with a negative EEG test are true healthy for this disease. In conclusion, if the result of this study will be confirmed in the future by additional studies, this could lead to using the EEG as tier II confidence level test or screening test, also before use of MRI and LCR tests, in the diagnosis of canine idiopathic epilepsy.

## **INTRODUZIONE**

L'elettroencefalografia (EEG) è un esame elettrodiagnostico impiegato nello studio di diverse malattie neurologiche di origine centrale dell'uomo e degli animali. Per la sua natura non fornisce informazioni eziologiche, ma esclusivamente funzionali delle strutture nervose cerebrali e, in rari casi, sull'origine neuro-anatomica delle anomalie. Questa tecnica studia l'espressione dell'attività elettrica spontanea della corteccia cerebrale sotto forma di pattern ondulatori dei potenziali elettrici. L'EEG permette di analizzare l'attività elettrica cerebrale in diverse condizioni come la veglia, il sonno, o in alcune condizioni patologiche d'attivazione corticale. Inizialmente fu impiegata per lo studio delle diverse forme di epilessia e successivamente fu estesa a tutti i casi di lesione cerebrale, data la bassa invasività e la facilità di approccio con il malato. L'elettroencefalografia è quindi l'unica tecnica che permette un monitoraggio nel tempo della funzione cerebrale e può evidenziare anomalie funzionali anche in assenza di lesioni strutturali documentabili.

In medicina umana il suo impiego nello studio dell'epilessia è ancora oggi di primaria importanza e, fino all'avvento delle moderne tecniche di neuroimaging, è stato considerato il migliore strumento non invasivo per la localizzazione delle lesioni cerebrali focali e la caratterizzazione delle encefalopatie diffuse. Anche se negli ultimi decenni questa tecnica diagnostica è stata sostituita in molti campi dalle moderne tecniche di neuroimaging, il suo impiego non è diminuito, anzi sta aumentando in altre situazioni cliniche e con altre finalità. Infatti, per la sua elevata risoluzione temporale, la scarsa invasività ed il basso costo di esecuzione, l'EEG è sempre più utilizzato nel monitoraggio dell'attività cerebrale in sala operatoria, nelle unità di cura intensiva e nei centri di medicina d'urgenza, oltre che nel classico studio e monitoraggio dell'epilessia idiopatica (Wilner, 2013).

In Medicina Veterinaria, anche se l'EEG è impiegato da molto tempo, le pubblicazioni scientifiche sull'argomento sono scarse, e difficilmente confrontabili a causa

dell'assenza di protocolli standardizzati d'esecuzione (Fox 1967; Klemm, 1968; Klemm, 1972; Pellegrino, 2004). Tuttavia in questi ultimi anni l'uso dell'EEG nel cane ha suscitato e sta suscitando sempre più interesse clinico. Già nel 1970 alcuni studiosi si interessarono all'applicazione della tecnica elettroencefalografica nel cane (Fox, 1967). Successivamente, con lo sviluppo degli elettroencefalografi digitali e con loro particolari software dedicati, sono stati pubblicati studi approfonditi su classificazione elettro clinica, sviluppo e uso dell'EEG nel controllo della terapia dell'epilessia canina (Lan, 1990; Berendt 1999; Bergamasco 2003; Kis, 2014; Brinkmann, 2015;).

Il presente lavoro ha lo scopo di calcolare specificità e sensibilità del test EEG analizzando i dati raccolti su un campione di 152 cani con epilessia. La tecnica usata e i risultati ottenuti saranno di seguito descritti e discussi dopo un'accurata review sullo stato attuale delle conoscenze sull'epilessia canina e una descrizione teorica dell'elettroencefalografia e delle sue applicazioni in medicina umana e veterinaria.

# 1. EPILESSIA

## 1.1 Definizione

L'epilessia nell'uomo è conosciuta sin da i tempi più antichi e, nelle diverse culture, l'uomo ha cercato di spiegarla facendo riferimento a fenomeni sovranaturali. Il termine "epilessia" deriva dal greco "epilambànein", che significa essere colti di sorprese, rapiti, posseduti da una sindrome o un insieme di sintomi causati da una grande varietà di malattie neurologiche. Questo termine non indica una specifica ed univoca patologia, ma bensì un insieme di patologie cerebrali complesse, con una vasta gamma di cause e manifestazioni cliniche. Quindi la condizione necessaria affinché si possa parlare di epilessia è la presenza e la ricorrenza nel tempo di crisi epilettiche o convulsive (Berg, 2010a).

La prima doverosa distinzione concettuale e terminologica si deve fare fra "crisi epilettica" ed "epilessia". Secondo la definizione adottata dalla ILAE, il termine inglese "epileptic seizure", tradotto in italiano letteralmente con "crisi epilettica", definisce la transitoria manifestazione di segni clinici che riflettono un'abnorme, eccessiva e ipersincrona, attività neuronale a livello cerebrale. In questa nuova definizione viene introdotto il concetto che le crisi epilettiche possano originare anche da strutture sottocorticali e non solo dalla corteccia cerebrale come si riteneva fino a qualche tempo fa.

Il termine epilessia invece definisce una malattia cronica dell'encefalo, caratterizzata dal ricorrere di crisi convulsive nel tempo (Fisher, 2005; Blume, 2001). L'epilessia quindi, piuttosto che una specifica malattia, è un "termine ombrello" usato per indicare un complesso eterogeneo di patologie. Sarebbe forse dunque più corretto, come accade in medicina umana, parlare di "epilessie", al plurale, piuttosto che di epilessia facendo pensare ad una specifica ed univoca patologia. Inoltre va detto che

il termine “convulsione” è considerato non scientifico, ma proprio del linguaggio parlato, pur indicando concettualmente una crisi epilettica. Quindi le dizioni “crisi epilettica”, “crisi convulsiva” possono grossolanamente essere considerati concettualmente come sinonimi, tuttavia dal punto di vista terminologico è più corretto parlare di “crisi epilettica”.

La drammaticità di una crisi convulsiva è percepita dal proprietario come un evento catastrofico, rispetto al quale si sente sgomento e impotente, con un impatto emotivo a volte devastante.

In medicina umana, la dimostrazione di un'avvenuta crisi epilettica si fonda sul riconoscimento della sintomatologia clinica, associato alla documentazione di un'abnorme attività elettrica cerebrale, tramite l'elettroencefalografia (Vedi Cap. II). Diversamente da quanto accade nell'uomo, nella quotidiana pratica veterinaria le crisi epilettiche si riescono a documentare principalmente sulla base della fenomenologia clinica. Per questo motivo, la loro documentazione non può arrivare alla precisione della medicina umana, tanto più che anche negli animali, esistono manifestazioni parossistiche che, in assenza di un riscontro elettroencefalografico, fanno discutere circa la loro presunta origine neurologica.

## 1.2 Cenni storici sull'epilessia

Nell'antica Grecia l'intera tradizione culturale da Omero ad Erodoto, la religione popolare, la dottrina medica stessa, come si era sviluppata ad opera dei sacerdoti-medici nei templi di Asclepio, concepivano come normale un diretto intervento della divinità sullo sviluppo delle malattie, come appunto l'epilessia. Quindi la comparsa di un fattore divino, o in ogni modo trascendente, come diretto protagonista dei fenomeni naturali, annullava di fatto la possibilità da parte dell'uomo di comprendere la vera causa del fenomeno e, per ottenere la guarigione da questa malattia, era così

invocato l'aiuto della divinità (Iannaccone, 2000a). Tra i più antichi rituali di guarigione utilizzati in Grecia per guarire l'essere umano dall'epilessia, va ricordata la "pratica dell'incubazione", che consisteva nel far dormire sopra una lastra di pietra l'individuo affetto da epilessia nel tempio d'Esculapio, il Dio dell'arte medica, attendendone la guarigione (Magliano, 1994).

Nonostante le interessanti e innovative descrizioni cliniche dell'epilessia di molti autori del passato, le cure di questa patologia continuarono per molto tempo ad avere forti connotazioni magiche. Per esempio era unanimemente considerata fondamentale l'influenza della luna piena sulla ricorrenza degli attacchi epilettici. Per curare questa malattia si utilizzavano frequentemente i semi e le radici della peonia, si faceva grande uso della polvere delle ossa di cranio e di sangue umano. A questo proposito, vi era anche l'usanza nel passato, com'è testimoniato da Plinio il Vecchio, di cospargere di sangue umano la bocca di un epilettico o di fargli succhiare il sangue che usciva dalla bocca di un gladiatore morente per trarne risultati terapeutici (Iannaccone, 2000b).

Il primo grande autore del passato a rifiutare il carattere soprannaturale delle malattie mentali fu il medico greco Ippocrate di Cos, il quale tra l'altro scrisse un trattato sull'epilessia "*De morbo sacro*" nel V sec a.C. (Armocida, 1993). Ippocrate, opponendosi alla tradizione culturale a lui precedente, indicò un nuovo approccio alla malattia, un approccio scientifico che non escludeva la divinità dalla vita dell'uomo ma che rifiutava la presenza diretta e personale del divino nella natura.

Gli scritti ippocratici, databili intorno al V e al IV secolo a.C. e non tutti attribuibili al grande medico greco, sono ricchi d'innovatrici teorie sulla patologia generale, ed in particolare sulle patologie del cervello. Nel Corpus Ippocratico vi sono molti riferimenti all'epilessia e alle convulsioni, ma in questo caso è il libro sul "Morbo Sacro" che riveste il maggior interesse. Il Trattato sull'epilessia o Morbo Sacro, com'era appunto definita l'epilessia ai tempi di Ippocrate, risulta non solo essere la

prima descrizione non fantastica della crisi epilettica, ma rileva anche sottili differenze tra le diverse manifestazioni cliniche di questa malattia. Nella prima parte di questo testo è evidente il tentativo d'Ippocrate di far capire che questa malattia non aveva nulla di divino, né di demoniaco, ma che era simile a tante altre malattie e quindi provocata da una causa naturale. Secondo Ippocrate l'affermazione che l'epilessia fosse un morbo sacro consentiva agli antichi medici di crearsi un alibi per l'insuccesso della terapia, che in realtà era dovuto all'ignoranza circa le vere cause dell'epilessia. Di conseguenza i medici greci consigliavano una gran varietà di trattamenti tra cui le purificazioni, gli incantesimi e l'astinenza da certi cibi e bagni. Per l'inefficacia di questi trattamenti erano incolpati gli Dei, e il medico quindi si sottraeva da ogni responsabilità.

L'altro significativo contributo alla conoscenza dell'epilessia fornito da quest'opera ippocratica è rappresentato dall'affermazione circa le basi fisiologiche del disturbo. Infatti nella seconda parte del trattato Ippocrate afferma che il cervello è la sede di tale malattia e di tutte le malattie mentali, con la possibilità di analizzarne i meccanismi e di curarla senza alcun ricorso a superstizioni e magia. Il cervello, presentato da Ippocrate nella triplice dimensione psicologica-fisiologica-patogenetica, è posto come alternativa offerta dal sapere scientifico alle credenze tradizionali e alla superstizione. In particolare in questo testo Ippocrate, per spiegare l'origine di questa malattia, utilizza la sua famosa "teoria umorale" secondo la quale lo stato normale dell'essere umano consisteva in un equilibrio di "umori": flegma, bile nera, bile gialla e sangue. Secondo Ippocrate l'equilibrio mentale di un essere umano si realizzava nel momento in cui tali umori rimanevano legati ai composti organici cui avevano dato origine, e questi ultimi non venivano lesi o alterati. Nelle pagine ippocratiche troviamo il tentativo di spiegare l'epilessia come un eccesso di "flegma", provocato da raffreddamenti che portano ad una secrezione eccessiva di muco da parte del cervello. Inoltre nella determinazione e descrizione dello stato

patologico, accanto alla teoria umorale, Ippocrate dava importanza ad una serie d'altri fattori tra i quali: fattori anatomici, dietetici, geografici e psicologici (Rosselli, 1996). Ad Ippocrate si deve tra l'altro l'aver posto, attraverso la sua attività di ricerca, le basi della neurologia scientifica, senza poter in realtà approfondire i suoi studi e giungere a risultati concreti per mancanza di strumenti e per il mancato sviluppo d'altre discipline, non riuscendo ad ottenere così sul piano pratico la tanto desiderata vittoria sulla superstizione.

Gli studi e le osservazioni sull'epilessia subirono un lungo periodo di stasi durante tutto il Medioevo, epoca nella quale la spiegazione razionale dei fenomeni morbosi fu abbandonata a favore di una concezione demonologica che sembrava far ritornare la medicina in epoca pre-ippocratica. In questo periodo gli epilettici erano considerati "posseduti dal demonio" e contagiosi per i propri simili e questo fece sì che si diffondessero ovunque pratiche d'esorcismo molto violente, che spesso provocavano la morte dell'ammalato, e che il fanatismo religioso condizionasse completamente il trattamento di questi particolari pazienti. Non era infrequente inoltre che donne epilettiche rimaste incinte venissero sepolte vive con la propria prole, e che gli uomini fossero brutalmente castrati. Le pratiche tradizionali e magiche continuarono ad essere utilizzate ancora per secoli e a rappresentare le uniche speranze di guarigione per gli epilettici d'ogni dove.

Quindi con nessun successo terapeutico e con questi discutibili sistemi si arrivò alla prima metà del diciannovesimo secolo, che deve essere considerata l'epoca fondamentale per la diagnosi e la terapia dell'epilessia. Dopo i primi studi scientifici del secolo effettuati dal francese Bravais nel 1827, fu Jackson che nel 1861 affermò, con la sola osservazione clinica, che la crisi epilettica dipende da "una scarica occasionale, improvvisa, eccessiva e rapida, localizzata nelle cellule nervose della materia grigia" (Jackson, 1931). Gli studi di Jackson permisero di porre le basi neurofisiologiche per la comprensione della scarica epilettica e per la nascita della

chimica di sintesi, quindi per la terapia dell'epilessia. Difatti nel 1912 Hauptmann introdusse in terapia il fenobarbitale, un composto con un'attività anticonvulsivante intensa e poco tossico (Hauptmann, 1912).

Nei primi decenni del Novecento i grandi progressi dell'anatomia avevano portato a comprendere i principi organizzativi della struttura generale e microscopica del sistema nervoso così come le indagini diagnostiche compirono un eccezionale passo in avanti. Le dimostrazioni di Galvani e poi di Aldini sull'elettricità animale erano state definitivamente confermate entro la prima metà dell'Ottocento da Matteucci e Du Bois Reymond, e più tardi da Hermann, su preparati sperimentali di nervo e muscolo. Solo nel 1875 Richard Caton (1842-1926) presentò alla riunione della British Medical Association l'evidenza di variazioni di potenziale elettrico evocate nella corteccia del coniglio e della scimmia da vari tipi di stimolazione sensoriale, poi pubblicata nello stesso anno (Caton, 1875). L'evidenziazione delle piccole variazioni di potenziale evocate dagli stimoli fu resa possibile dall'impiego di un galvanometro a specchio il cui raggio riflesso veniva proiettato a distanza sulla parete. Grazie a questo sistema di amplificazione ottica, Caton fu in grado di osservare piccole fluttuazioni spontanee del potenziale che egli analizzò modificando la disposizione degli elettrodi di registrazione, confermandone la costante presenza abolita solo dalla morte dell'animale. Si trattava della prima dimostrazione dell'attività spontanea della corteccia cerebrale, che è alla base dell'elettroencefalogramma (EEG). La limitata risonanza che ebbero questi dati nell'ambiente dei fisiologi fece sì che l'attività spontanea corticale fosse successivamente «riscoperta» da altri ricercatori ignari della precedente pubblicazione di Caton. Tuttavia si deve al tedesco Berger la prima registrazione nel 1921 dell'attività elettrica celebrale nell'uomo. Berger, psichiatra presso l'Università di Jena, iniziò gli studi che lo portarono alla messa a punto della registrazione dell'EEG dell'uomo all'età di 52 anni, nel 1925, e pubblicò il primo lavoro nel 1929 (Berger, 1929). In questa pubblicazione e in quelle degli anni successivi si

dimostrava che l'attività dominante, il ritmo da lui definito "ritmo alfa", di frequenza intorno ai 9-10 Hz, registrabile con elettrodi posti sulla superficie del cuoio capelluto in condizioni di riposo ad occhi chiusi, era effettivamente generato dalla corteccia cerebrale e mostrava una specifica reattività alla apertura degli occhi, che la sopprimeva. Questa risposta del ritmo alfa, come presto Berger dimostrò, non è specificamente legata alla stimolazione visiva generata dalla apertura degli occhi né ad alcun altro specifico tipo di stimolazione, ma alla condizione di allerta. Inizialmente i risultati delle ricerche di Berger non vennero accolti con grande entusiasmo dalla comunità scientifica. Il merito del superamento della diffidenza che circondava l'opera di Berger è dovuto ad un grande scienziato inglese, Lord Edgar D. Adrian (1889-1977), che nel 1933 ripeté gli esperimenti di Berger confermando inoppugnabilmente le sue osservazioni (Adrian, 1934a). Negli anni successivi, la tecnica di registrazione dell'EEG fu messa a punto in vari laboratori europei, statunitensi e canadesi, e nel dopoguerra, ormai riconosciuta come tecnica diagnostica irrinunciabile, essa raggiunse rapidamente diffusione ubiquitaria nei servizi di neurologia. A tutt'oggi l'EEG rappresenta un presidio diagnostico fondamentale per la diagnosi e lo studio dell'epilessia, grazie all'estrema sensibilità nella rilevazione delle scariche durante le crisi e di alterazioni significative in fase inter-critica o inter-ittale (Vedi CAP II). Su queste basi fu finalmente possibile interpretare la cospicua mole di informazioni empiriche sulla fenomenologia epilettica, acquisita nel corso dei secoli, secondo una visione biologica coerente basata su correlazioni tra disfunzione di una determinata regione del sistema nervoso centrale e lo specifico sintomo epilettico che ne deriva.

In medicina veterinaria lo sviluppo delle conoscenze sull'epilessia ha seguito un percorso analogo. In passato gli animali sono stati usati come modello di studio dell'epilessia nell'uomo, provocando in laboratorio traumi o lesioni intracraniche, osservando e studiando l'instaurarsi della crisi epilettica. Anche in studi recenti il cane

viene utilizzato come modello di studio per l'epilessia umana (Potschka, 2013). Già verso la fine dell'800 si parlava di epilessia negli animali domestici con diversi esperimenti descritti. Per esempio Brown-Séguard si accorse che alcune lesioni provocate a livello di midollo spinale e nel peduncolo cerebrale potevano essere sufficienti a provocare epilessia negli animali. Seguì la teoria anemica di Kiissmaul e Tenner, i quali scoprirono che forme di anemia a livello cerebrale erano strettamente correlate a crisi epilettiche negli animali. Ziehen dimostrò che l'irritazione della parte posteriore dei corpi quadrigemini era sufficiente a causare epilessia, infine Horsely scoprì che l'irritazione della corteccia cerebrale era la causa della comparsa di crisi epilettiche generalizzate tonico-cloniche (Easton, 1892). Nel 1923 un gruppo di medici sotto la guida del Dr. Frederick Tilney sviluppò uno studio critico della letteratura sull'epilessia negli animali, mettendo in luce tutte le teorie e le contraddizioni presenti su questo argomento, cercando di chiarire eziologia e meccanismo biochimico sottostante la crisi epilettica. Tilney dimostrò che anche negli animali l'epilessia è causata da una iperattività della corteccia cerebrale (Elsberg, 1923). Successivamente Pike e Elsberg osservarono l'instaurarsi di crisi convulsive toniche-cloniche in giovani gatti privi di corteccia motoria, questo permise loro di supporre cause sottocorticali ed extracraniche come possibili fattori responsabili di epilessia (Pike, 1925).

Attraverso questo lunghissimo, spesso tragico e doloroso viaggio, che ha di volta in volta attraversato i confini dell'indecifrabile, della presenza divina, della magia e del diabolico, l'epilessia è divenuta oggi una malattia socialmente accettabile, diagnosticabile e curabile.

### 1.3 Fisiopatologia e patogenesi dell'epilessia

Nel meccanismo di sviluppo di una crisi epilettica riveste un ruolo di fondamentale importanza lo squilibrio tra i meccanismi di eccitazione e di inibizione a livello dei neuroni cerebrali. La caratteristica saliente di tutte le crisi epilettiche è l'aumento persistente dell'eccitabilità neuronale (Platt, 2014).

Nel XX secolo le conoscenze sulla morfologia e sulla funzione dell'elemento fondamentale del tessuto nervoso, il neurone, si sono arricchite notevolmente. La microelettrofisiologia, per mezzo di registrazioni microelettriche (intra- ed extracellulari) dell'attività elettrica dei singoli neuroni, ha dato importanti informazioni sulla genesi dell'impulso nervoso. Il neurone viene definito come una cellula attiva, in equilibrio dinamico, che impiega una notevole quantità di energia per mantenere il potenziale di membrana di -70mVolt, grazie al lavoro di particolari proteine transmembrana (pompe ioniche cellulari) che mantengono contro gradiente di concentrazione cariche elettriche, costituite da ioni ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), all'interno o all'esterno della cellula. In particolare le pompe cellulari mantengono un eccesso di cariche positive extracellulari, mentre l'interno della cellula viene mantenuto negativo formando un equilibrio dinamico di -70mV.

Lo stato di equilibrio dinamico di una cellula nervosa può venire modificato dall'azione di altre cellule attraverso gli effetti prodotti da neurotrasmettitori liberati nelle sinapsi dendritiche. La liberazione di un neurotrasmettitore eccitatorio o inibitorio nello spazio inter-sinaptico produce una modificazione limitata del potenziale di membrana, causando, rispettivamente, una depolarizzazione o una iperpolarizzazione locale. Il più importante neurotrasmettitore con funzione eccitatoria è il glutammato (Lipton, 1994).

Affinché questi eventi locali possano avere un'influenza decisiva sul neurone e sullo sviluppo di un potenziale d'azione, deve verificarsi una sommazione spaziale (molte

sinapsi che scaricano contemporaneamente) o temporale (sinapsi che scaricano ripetutamente nel tempo) degli eventi depolarizzanti o iperpolarizzanti (Lipton, 1994). Nel cervello normale esistono meccanismi di fine regolazione che servono a prevenire la depolarizzazione sincrona ed eccessiva di neuroni contigui. L'eccitazione di alcuni neuroni, di norma, attiva automaticamente anche circuiti di neuroni inibitori che hanno lo scopo di creare un gruppo di cellule limitrofe iperpolarizzate che impediscono la diffusione esagerata di stimoli che, se non fermati, potrebbero invece portare a quella "deriva" di ipereccitazione parossistica e ipersincrona che è alla base della manifestazione epilettica (Podell 1994; De Deyn, 2013; Hulsmeier, 2010).

Il cervello di un soggetto epilettico è, per svariate ragioni, impossibilitato a bloccare efficacemente un'eccessiva eccitazione neuronale. All'interno dell'encefalo esistono aree di neuroni più suscettibili all'ipereccitazione (c.d. cellule "pacemaker") e, pertanto, più predisposte a diventare foci epilettogeni, cioè aggregati neuronali dotati di intrinseca facilità alla depolarizzazione.

In assenza di un'efficace funzione inibitoria, le cellule pacemaker possono reclutare altre cellule nelle aree circostanti e dare inizio ad un incremento di attività eccitatoria che, attivando un vero e proprio circolo vizioso, esita in un aumento esponenziale dell'eccitazione. Si verifica dapprima la formazione di un focus epilettogeno (ovvero di un aggregato di neuroni in preda ad una deriva eccitatoria parossistica) e, successivamente, il reclutamento di altri neuroni e lo sviluppo di un'attività epilettogena che può diffondere, attraverso connessioni intra- ed inter- emisferiche, ad altre aree del cervello. Se viene reclutato un numero critico di neuroni si sviluppa la crisi convulsiva clinicamente manifesta (Podell, 2013).

Nonostante i numerosissimi studi effettuati per comprendere l'epilettogenesi, gli innegabili progressi compiuti hanno contribuito solo parzialmente alla comprensione dei meccanismi che stanno alla base del fenomeno. Diversi sono gli attori di un processo che presenta complicati risvolti e che, pur non avendo modalità univoche

di azione, esita in una eccitazione parossistica e ipersincrona dei neuroni. Attualmente, sono relativamente chiari i nessi causali tra un'abnorme scarica neuronale e traumi, tumori, infezioni, ipossie e specifiche alterazioni metaboliche (De risio, 2014a).

Per moltissimi casi non è invece possibile trovare fattori causali, e la comprensione del fenomeno epilettogeno è ancora parziale. In una visione semplificata, la crisi epilettica è ancor oggi considerata come il risultato di un'incapacità dei sistemi inibitori GABA-ergici a svolgere la loro funzione di modulazione sull'attività cerebrale, per cui i fattori patogenetici dell'epilessia possono essere schematicamente suddivisi in tre gruppi: la predisposizione alle crisi (convulsività), il focolaio epilettico e lo stimolo epilettogeno.

La convulsività è condizionata da uno stato della membrana neuronale facilitante l'attività ritmica automatica e da una facilitazione verso l'attività sincrona e ritmica di estese popolazioni neuronali. Dal punto di vista funzionale ogni altra componente cerebrale può influenzare la convulsività: per esempio, l'esistenza di vie preformate o predisposte che sono sfruttate dall'attività epilettica del focolaio primario per propagare in altre strutture, talora verso regioni distanti ed estese dell'encefalo, oppure l'attività del sistema aspecifico che può influenzare la predisposizione verso crisi generalizzate.

Il focolaio epilettico è il punto reale o potenziale di origine e di propagazione della crisi. Può essere localizzato nella corteccia o in altre strutture cerebrali sottocorticali. Nell'area che lo delimita la predisposizione alle crisi è aumentata. Di tanto in tanto i potenziali elettrici dei neuroni in essa compresi vanno incontro a una sincronizzazione il cui corrispettivo elettrofisiologico è rappresentato dall'attività epilettica focale che può essere registrata con l'impiego dell'elettroencefalografia (spikes elettroencefalografici focali, Vedi Cap II).

A livello cellulare essa corrisponde a un'improvvisa e transitoria depolarizzazione della membrana accompagnata da una scarica di impulsi (spikes cellulari), che viene generalmente interrotta da una ripolarizzazione (o iperpolarizzazione) della membrana neuronale indotta principalmente dal feedback inibitorio (De risio, 2014a). Fra le cause scatenanti di un focolaio epilettico le più frequenti sono rappresentate da traumi cerebrali, lesioni infiammatorie o circolatorie del tessuto nervoso. Per chiarire i meccanismi che sono alla base dell'epilettogenesi a seguito di lesione tessutali, in passato, sono stati eseguiti esperimenti su animali provocando un focolaio epilettogeno artificiale inoculando alcune sostanze tossiche nel cervello (penicillina, idrossido di alluminio, cobalto, ecc.). Recenti ricerche morfologiche su questi focolai sperimentali, eseguite al microscopio elettronico, hanno dimostrato che nell'area attiva di un focolaio epilettico è possibile spesso osservare neuroni privi di sinapsi esclusivamente o prevalentemente nel soma, cioè nella zona dove probabilmente è situata la maggioranza delle sinapsi inibitorie (Fisher, 1969). Si può quindi supporre che in tali neuroni sia disturbato il feedback inibitorio. Tuttavia è stato descritto che essi siano anche privati del contatto con cellule di altro tipo, come ad esempio le cellule della nevroglia (astrociti), che rappresentano un'altra importante componente del tessuto nervoso. Gli astrociti partecipano attivamente al metabolismo neuronale, in particolare contribuendo al mantenimento del valore normale del potenziale di membrana a riposo. Nelle cicatrici cerebrali gli astrociti sono rimpiazzati da un diverso tipo di cellule gliali (glia fibrosa) alle quali con tutta probabilità mancano le proprietà metaboliche sopra riferite. Da questo è possibile dedurre che in caso di lesioni al tessuto nervoso, la fibrosi conseguente contribuisce a un notevole calo della polarizzazione delle membrane neuronali, che giunge così a valori assai prossimi al livello soglia responsabile di attività auto ritmica (Trachtenberg, 1970; Wetherington, 2008).

Il terzo fattore patogenetico è la presenza di uno stimolo epilettogeno di varia natura: fisico, chimico, ma anche emotivo ed endogeno. In esperimenti su uomo e animali è stato dimostrato che è possibile scatenare la scarica di un focolaio epilettico per mezzo di stimoli epilettogeni adeguati, stimolando adeguatamente un recettore sensoriale o effettuando la stimolazione elettrica di una via afferente (Amantea, 1920; Clementi, 1929). Queste metodiche facilitanti la crisi epilettica clinicamente manifesta vengono chiamate tecniche di attivazione.

Quando si crea un focolaio epilettico in una determinata area del cervello, la crisi epilettica può rimanere limitata in quella zona o diffondere fino a coinvolgere entrambi gli emisferi cerebrali e questo dipende dall'attivazione delle vie nervose intra- ed interemisferiche, anche se in molti casi la scarica epilettica rimane limitata alla zona del focolaio epilettico, in certe condizioni l'attività epilettica si propaga interessando vasti distretti cerebrali e in modo particolare del diencefalo. Questo fenomeno è stato ampiamente studiato con ricerche sperimentali ed è stato così dimostrato che le scariche e la crisi si propagano in modo preferenziale attraverso alcune vie preformate dell'encefalo, quelle connessioni interemisferiche, il corpo calloso ed altre commissure, e che la propensione alla convulsività delle diverse regioni cerebrali non è uguale, infatti oltre alla corteccia cerebrale anche alcune regioni sottocorticali hanno una forte tendenza a convulsivare. Vie importanti per la propagazione delle scariche sono le connessioni interemisferiche, il corpo calloso ed altre commissure (Musgrave, 1980; Gloor, 1988; Badaway, 2012).

Fra le regioni encefaliche che sembrano avere una maggiore importanza nella propagazione e generalizzazione delle crisi nei due emisferi sono riportati distretti diencefalici, come ad esempio il talamo. Le connessioni tra la corteccia cerebrale e il talamo (circuiti talamo-corticali) giocano senza dubbio un ruolo importante nella genesi delle oscillazioni ritmiche dei potenziali elettrici registrati dall'elettroencefalografia, per esempio nella sincronizzazione dell'attività elettrica di

estese popolazioni di neuroni. infatti tali strutture partecipano anche alla sincronizzazione dell'attività elettrica dei due emisferi. Un'altra importante struttura che è in grado di influenzare l'attività elettrica di una vasta area di corteccia è la regione del setto, che sembra avere un'influenza importante sull'attività ippocampale nella regione dei lobi temporali (Petsche, 1962).

#### 1.4 Classificazione delle crisi epilettiche

Le classificazioni delle crisi epilettiche e dell'epilessia nel cane seguono in gran parte le linee guida stabilite dalla ILAE (International League Against Epilepsy) per la medicina umana (Berendt, 2015; De Risio, 2014b; Mariani, 2013; Berg, 2010b; Fisher, 2005).

Per l'epilessia si utilizza una classificazione di tipo eziologico e una classificazione clinica, basata sulla tipologia delle crisi epilettiche. In medicina veterinaria la suddivisione su base eziologica comprendeva tre categorie: l'epilessia idiopatica (primaria o genetica), l'epilessia secondaria (o sintomatica) e l'epilessia criptogenetica. Quest'ultima categoria, oggi da alcuni autori sostituita con il termine "epilessia di origine sconosciuta", definisce una forma considerata "border line" tra l'idiopatica e la secondaria, in quanto si presumeva che potesse risultare da lesioni strutturali non documentabili nell'animale vivo con la diagnostica collaterale attualmente conosciuta (Mariani, 2013).

In medicina umana la più recente classificazione ILAE ha modificato la nomenclatura esistente ridefinendo queste tre categorie in: epilessia genetica (idiopatica); epilessia strutturale/metabolica; epilessia di origine sconosciuta. Questa nuova classificazione non prevede più la definizione di "epilessia idiopatica", anche se questo termine è ben radicato nel linguaggio comune e, verosimilmente nella maggior parte dei casi, si riferisce ad una epilessia genetica senza danni strutturali all'encefalo, in cui il

difetto genetico è il candidato responsabile più probabile che causa le crisi epilettiche (Berg, 2010b).

In medicina veterinaria, invece, vengono incluse nella categoria di “epilessia idiopatica” le forme genetiche o sospette genetiche, cioè nei casi in cui la predisposizione di razza produca una prevalenza >2%, e le forme di epilessia in cui la causa non è conosciuta e le indagini cliniche strumentali (MRI, EEG) non danno indicazioni riconducibili a forme di epilessia strutturale. L’epilessia idiopatica è inoltre caratterizzata da una determinata età d’insorgenza, attualmente compresa tra i sei mesi e i sei anni d’età (Mariani, 2013).

L’epilessia strutturale (secondaria o sintomatica) è caratterizzata dalla presenza di crisi epilettiche causate da alterazioni strutturali del cervello. Queste alterazioni possono essere di natura vascolare, infiammatoria/infettiva, traumatica, displasica, neoplastica o degenerativa. La diagnosi viene confermata dagli esami di diagnostica per immagine, dai risultati dell’analisi del liquido cefalo-rachidiano, da test su DNA o dai reperti patologici post mortem (De Risio, 2015).

Le crisi che originano da patologie extracraniche sono ancor oggi in molti casi definite “crisi reattive” e non sono incluse in una specifica forma di epilessia, in quanto, come definito dalle indicazioni dell’ILAE, la definizione di epilessia implica la presenza di un’anomalia epilettica persistente all’interno del tessuto nervoso (Berg, 2010b). Pertanto, crisi anche ripetute nel tempo dovute a transitorie perturbazioni extracraniche (metaboliche o tossiche) non vengono chiamate epilessia (Bjork, 1970; Engel 2006). Nel cane sono relativamente frequenti forme di “crisi reattive” e le cause sono da ricondurre a diversi agenti quali ipoglicemia, disturbi elettrolitici, encefalopatia epatica, ipotiroidismo, encefalopatia uremica, ipossia e iperglicemia. Le cause più comuni di convulsioni reattive nel cane sono le intossicazioni e l’ipoglicemia (Brauer, 2011).

La classificazione di tipo clinico delle crisi epilettiche comprende tradizionalmente una prima suddivisione in crisi ad esordio focale (crisi focali o parziali) e crisi ad esordio generalizzato (crisi generalizzate). Sebbene non esista un accordo sull'uso dei termini focale e parziale, un volume di recente pubblicazione preferisce il termine focale, in accordo con le ultime linee guida ILAE (De Risio, 2014b).

Secondo la più moderna definizione, una crisi focale è "una crisi che origina all'interno di circuiti neuronali limitati ad un emisfero" (Berg, 2010b). Tali circuiti possono comprendere strutture corticali e sottocorticali.

Le crisi focali vengono a loro volta suddivise in crisi focali semplici e crisi focali complesse. Le prime sono caratterizzate da fenomeni epilettici localizzati, come ad esempio i tic, cioè tutti quei movimenti incontrollati, rapidi e ripetitivi che l'animale esegue inconsciamente. Un esempio è l'ammiccamento ripetuto e stereotipato, il lambimento del naso, la contrattura del labbro o della palpebra. Le crisi focali complesse sono caratterizzate da fenomeni motori, sensoriali e vegetativi associati ad alterazioni dello stato mentale (Berendt, 2004, Berendt 2009).

Alcuni esempi di crisi focali complesse sono rappresentati da animali che durante l'episodio critico diventano aggressivi, mutano carattere, appaiono ansiosi o con "allucinazioni", comportamenti questi più o meno associati ad alterazioni motorie. In passato le crisi motorie con alterazione dello stato mentale venivano definite "psicomotorie" proprio per sottolineare il contemporaneo interessamento di diversi distretti encefalici. Fra questo gruppo alcuni autori fanno rientrare la "fly biting syndrome o jaw snapping syndrome" che può colpire svariate razze canine di piccola taglia, i quali tendono a mordere con un movimento a scatto l'aria circostante o un oggetto immaginario nel vuoto (Wrzosek, 2015). La "fly biting sindrome" è stata ben descritta nei Cavalier King Charles Spaniel, con una probabile predisposizione su base genetica (Rusbridge, 2005). Infine è considerata una crisi focale complessa il "tail chasing", nel quale il cane incomincia a girare su sé stesso in modo spasmodico ed

irrefrenabile nel tentativo di mordersi la coda. Questa forma di epilessia è stata ben descritta nelle razze Terrier (*Tiira, 2012*). Nelle crisi ad esordio focale, quindi, i sintomi clinici saranno strettamente correlati alle funzioni associate alle zone cerebrali colpite (*Volk, 2014; De Risio, 2014b*).

Le crisi ad esordio generalizzato riflettono un coinvolgimento immediato e diffuso delle strutture cerebrali e vengono espresse clinicamente da un'abnorme attività motoria in tutto il corpo. Infatti sulla base delle caratteristiche semiologiche è possibile classificare le crisi ad esordio generalizzato in: tonico-cloniche, toniche, cloniche, miocloniche, atoniche e assenze.

Le crisi generalizzate più frequentemente incontrate nella pratica clinica sono quelle di tipo tonico-clonico. Questa forma in passato veniva denominata come "Grande Male". Le crisi toniche, cloniche e miocloniche sono dei frammenti della crisi convulsiva tonico-clonica e possono paradossalmente indicare una condizione neurologica sottostante più grave, in cui un danno multifocale o diffuso dell'encefalo sembra essere di ostacolo alla ordinata sequenza reticolo-corticale della crisi convulsiva tonico-clonica. Le crisi cloniche si manifestano con spasmi muscolari, bilaterali e ritmici, alla frequenza di 2-3 cicli/s che coinvolgono simmetricamente gli stessi distretti muscolari, associate ad un prolungato disturbo della coscienza, critico e post-critico. Le crisi toniche sono caratterizzate da una contrazione muscolare protratta associata ad una breve alterazione della coscienza. Le crisi atoniche infine sono caratterizzate dalla repentina perdita di tono di uno o più arti o di tutto il corpo. Le forme atoniche sono le più rare nel cane e vanno ben distinte dalla narcolessia/cataplessia e dalle crisi sincopali (*Podell, 2013*). Le assenze sono estremamente difficili da riconoscere e documentare negli animali da compagnia, e rappresentano dei transitori disturbi dello stato di coscienza.

Le crisi epilettiche più frequenti e presenti nell'immaginario collettivo sono le forme generalizzate tonico-cloniche, conosciute come "convulsioni", per molti le "crisi" per

autonomia. Queste sono di norma caratterizzate da quattro fasi: la fase prodromica, l'aura, la fase ictale (ictus) e la fase post-ictale. La fase prodromica che identifica il periodo che precede l'inizio dell'attività convulsivante ha una durata estremamente variabile anche di diverse ore e in alcuni casi può non essere presente. Le manifestazioni cliniche caratteristiche sono la presenza di alterazioni comportamentali, in cui l'animale si mostra particolarmente ansioso, cerca insistentemente il proprietario, si nasconde e può emettere continue vocalizzazioni (De Risio, 2014b).

L'aura è la manifestazione iniziale di una crisi epilettica e nell'uomo è associata a specifiche alterazioni del tracciato elettroencefalografico, per cui è considerata parte integrante dell'evento convulsivo (Lehnertz, 2001). In medicina veterinaria il concetto di aura è dibattuto per la sua difficile documentazione, infatti viene considerata quella breve fase iniziale in cui si assiste ad una fenomenologia motoria o sensitiva (quest'ultima molto difficile da cogliere nei nostri animali) che dura pochi secondi e che precede la crisi generalizzata. Alcuni tendono a considerarla come la manifestazione focale che precede la generalizzazione di una crisi secondaria.

La fase ictale (ictus) è la fase convulsiva propriamente detta, che dura di norma da pochi secondi a pochi minuti. Il proprietario attribuisce generalmente all'ictus una durata superiore, sia per lo stress emotivo legato al momento, sia per la tendenza di questo ad includere nella fase ictale parte della fase successiva della crisi. Nella sua manifestazione tipica l'animale può mostrare un irrigidimento muscolare quando è ancora in stazione. A questa segue la caduta su un lato, accompagnata da perdita di coscienza e da ulteriore irrigidimento di tutti e quattro gli arti, opistotono e digrignamento dei denti (trisma). Infine il cane presenta contrazioni cloniche generalizzate con movimenti di pedalamo degli arti e di masticazione a vuoto. Inoltre possono comparire segni vegetativi quali scialorrea, perdita di feci e di urine (Podell, 2013; De Risio, 2014b).

La fase post-ittale è caratterizzata da anomalie transitorie che testimoniano l'eccessivo affaticamento neuronale patito durante la crisi. L'edema cerebrale, che si può formare in seguito alla crisi epilettica generalizzata, più o meno esteso a seconda del tipo e della durata della crisi, è il principale responsabile della sintomatologia che osserviamo nella fase post-ittale. In questa fase, che può essere assente o addirittura perdurare per alcuni giorni, si possono apprezzare le più svariate anomalie comportamentali e motorie: aggressività, paura, ansietà, disorientamento, ricerca compulsiva del proprietario. Questi segni sono associati o succeduti da altri sintomi quali atassia, tremori, amaurosi, ossia perdita temporanea parziale o completa della vista, vomito, polidipsia, polifagia e pica. Può capitare che il proprietario non assista alla fase ittale della crisi, poiché spesso le crisi epilettiche generalizzate sono più frequenti durante il sonno. Tuttavia si può comunque accorgere che il proprio animale ha avuto una crisi epilettica perché vede e riconosce la fase post-ittale (Podell, 2013; De Risio, 2014b).

## 2. ELETTROENCEFALOGRAFIA (EEG)

### 2.1 Evoluzione storica dell'EEG

Le basi storiche sulla possibilità di registrare un segnale bioelettrico, si devono ricercare negli esperimenti di pionieri quali Luigi Galvani (1737-1798), Alessandro Volta (1755-1832) e inglesi, come George Ohm (1787-1854) e Micheal Faraday (1791-1867), i quali dimostrarono che i tessuti viventi (soprattutto quelli muscolari) possedevano spiccate proprietà elettriche.

I primi tentativi di registrare un vero e proprio segnale elettroencefalografico dalla corteccia cerebrale di animali da esperimento furono effettuati al Royal Firmary di Liverpool fin dal 1870 da parte del fisiologo inglese Richard Caton (1842-1926) e negli anni successivi proseguirono questi studi sperimentali altri studiosi europei quali Beck e Cybulski in Polonia, Danilevsky in Russia (Caton, 1875; Collura, 1993).

Fu però un neuropsichiatra tedesco di Jena, Hans Berger (1873-1941), che nel 1929 pubblicò il primo report sull'EEG umano, seguito da altri importanti contributi negli anni successivi (Berger, 1929). Berger, che lavorava a stretto contatto con i neurochirurghi, cominciò con tentativi di registrazioni ottenute posizionando elettrodi direttamente al di sopra della corteccia cerebrale in pazienti con ampie finestre ossee dovute a traumi cranici bellici. Successivamente egli si dedicò alla registrazione dell'EEG sullo scalpo, con l'applicazione di due elettrodi, uno frontale e uno occipitale, utilizzando come volontario anche il figlio. Berger per i suoi studi elettroencefalografici aveva a disposizione un rudimentale apparecchio costruito da Siemens, con un galvanometro double-coil che garantiva una sensibilità di 130microVolt/cm (Collura, 1993). I primi EEG registrati da Berger su carta fotografica avevano una durata di 1-3 minuti, e consistevano in un canale EEG in derivazione bipolare fronto-occipitale, un canale per la registrazione simultanea

dell'elettrocardiogramma e un canale marcatempo (Fig. 1). Queste fondamentali esperienze consentirono a Berger di pubblicare, dal 1929 al 1937, 14 lavori scientifici, che comunque ebbero poco interesse e scarsa diffusione.



*Figura 1. Uno dei primi tentativi del Dr. Berger di registrazione EEG nell'uomo (1924). Immagine tratta e modificata da Collura, 1993.*

Nel 1934 a Cambridge, i due scienziati Lord Adrian e Brian Matthews, usando elettrodi superficiali e introducendo nell'apparecchiatura gli amplificatori differenziali a valvola (ancora oggi usati in alcune vecchie strumentazioni), ripeterono l'esperienza di Berger e pubblicarono i loro dati in inglese, rendendoli molto più accessibili a tutta la comunità scientifica anglofona. Essi confermarono quindi che il "Berger rhythm" era reale, scientificamente accettabile, di origine corticale e non correlato ad attività muscolare o ad artefatti vari (Adrian, 1934b; Compston, 2010). Fu Berger comunque che denominò per primo con la lettera greca "alfa" il normale ritmo di fondo occipitale tipico nella veglia, a occhi chiusi e la reattività alla loro apertura, con la lettera "beta" l'attività di frequenza più rapida, nomenclatura è rimasta immutata fino ai giorni d'oggi.

Dal 1935 in poi, negli Stati Uniti D'America, Hallowell Davis, Frederick Gibbs ed Erna Gibbs, alla Harvard Medical School di Boston, descrissero i principali pattern EEG sia fisiologici (in veglia e in sonno) sia patologici (nell'epilessia, nei disturbi di coscienza e in altre patologie) e grazie al primo atlante di EEG, pubblicato da Gibbs nel 1941 la metodica cominciò a diventare di utilizzo diagnostico in vari campi della neurologia e della medicina (Gibbs, 1941; Collura, 1993).

In Inghilterra, a partire dal 1936, grazie a W. Grey Walter, che fu l'inventore ed il costruttore del primo oscilloscopio capace di registrare su tre canali contemporaneamente, si cominciò ad utilizzare la metodica per la diagnosi di tumori cerebrali e come sistema rudimentale di monitoraggio, sia durante l'intervento chirurgico sia per obiettivare gli effetti dell'anestesia. Fu proprio Grey Walter che, seguendo l'esempio di Berger, denominò con le lettere greche Delta e Theta l'attività lenta della corteccia cerebrale. Inoltre Walter già nel 1943-44 introdusse i primi metodi per l'analisi automatica dei segnali bioelettrici cerebrali (un rudimentale qEEG). Fu anche il primo ad utilizzare l'EEG con lo scopo di localizzare i tumori cerebrali (Walter, 1937; Walter, 1969).

Anche in Italia grandi studiosi come Mario Gozzano a Roma (dal 1935) e Agostino Gemelli a Milano (dal 1937) cominciarono a effettuare i primi studi sull'EEG umano. Gozzano in particolare pubblicò nel 1935, purtroppo solo in lingua italiana, importanti studi effettuati sulla corteccia del cane al Brain Institute di Berlino, in uno dei primi laboratori EEG europei fondato da Kommueller, diventando in questo modo il più importante rivale di Berger. Gozzano stesso inoltre fu il fondatore della Società Italiana di EEG e Neurofisiologia Clinica e nel 1960 organizzò a Roma il 5° congresso Internazionale dell'IFSECN cioè International Federation of Society for EEG and Clinical Neurophysiology (Gozzano, 1935; Bentivoglio, 2010).

Prima della seconda guerra mondiale l'EEG, introdotto in Europa da Berger, ebbe un notevolissimo sviluppo soprattutto negli USA, sia dal punto di vista sperimentale sia

clinico, vedendo impegnati nel suo utilizzo fra i più validi scienziati dell'epoca come Gibbs, William Lennox, Bickford, Knot e tanti altri. Inoltre in quegli anni in Canada, presso il tuttora prestigioso Montreal Institute of Neurology, Wilder Panfield (neurochirurgo) ed Hebert Jasper (neurofisiologo) utilizzarono le registrazioni sia superficiali sia profonde intra chirurgiche per definire le funzioni del cervello e per studiare i vari tipi di epilessia (Jasper, 2012).

Subito dopo la seconda guerra mondiale l'elettroencefalografia ebbe un ulteriore enorme sviluppo, sia in Europa sia in America. Nel 1947 si tenne a Londra il primo congresso internazionale di EEG, ed è stato proprio in quella occasione che Jasper fondò la Federazione Internazionale delle Società di EEG (IFSECN); successivamente si fece un altro congresso a Parigi nel 1949. Questi due fondamentali congressi servirono a definire i primi parametri internazionali da utilizzare nelle registrazioni EEG, parametri che furono poi pubblicati sulla rivista "Journal of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology", attualmente denominata "Clinical Neurophysiology" (Collura, 1993).

Dal 1960 in poi l'EEG è stato utilizzato non solo come mezzo di studio e di diagnosi nel campo dell'epilessia e delle neoplasie intracraniche, ma anche come esame utile a livello diagnostico e prognostico in molti altri campi. Infatti l'EEG è stato usato per la definizione e standardizzazione dei vari stadi del sonno e ha fornito utili informazioni per lo studio dei suoi disturbi. L'atlante di Retchaffen and Kales, pubblicato nel 1968, costituisce tuttora la base per la definizione e lo studio della macrostruttura del sonno (Rodenbeck, 2006).

Dal 1980 grandi sviluppi hanno conseguito le metodiche per l'analisi computerizzata dei vari parametri EEG, resa possibile dall'introduzione in commercio dei primi apparecchi EEG digitalizzati e del loro progressivo miglioramento. Contemporaneamente la tecnologia ci ha consentito di poter disporre di strumenti

sempre più maneggevoli, utili anche per varie tecniche di neuro-monitoraggio, tipo l'EEG dinamico e il Video-EEG.

La storia dell'EEG segue in parallelo l'evoluzione delle apparecchiature necessarie per la sua registrazione. Il primo elettroencefalografo su carta (a 2 canali) fu costruito e commercializzato da Albert Grass nel 1936. Si trattava del Grass Model I che utilizzava tre amplificatori differenziali a valvola. Il Grass Model II, commercializzato nel 1939, disponeva di 4-6 canali mentre il Grass Model III, del 1946, disponeva già di una console con 8 o 16 canali. Di quest'ultimo modello nel dopoguerra ne furono venduti circa 5000 esemplari (Collura, 1993).

Nel 1950 Franklin Offner produsse il primo apparecchio EEG portatile (Offner Type T) che utilizzava amplificatori transistorizzati inventati nel 1947 dai Laboratori Bell. Tale tecnologia si sviluppò molto rapidamente e in pochissimi anni divenne insostituibile per tutti gli apparecchi EEG di alta qualità.

A partire dal 1980 l'avvento della tecnologia ha consentito di porre in commercio apparecchiature computerizzate (multifunzionali, espandibili e via via sempre più sofisticate) che hanno completamente rivoluzionato il settore. All'inizio gli elettroencefalografi digitali sono stati accolti con molta diffidenza dai neurofisiopatologi, sia per l'insufficiente risoluzione degli schermi sia per una sorta di affezionamento al tracciato stampato su carta. Per qualche anno si è discusso, anche in modo animato, del fatto che l'EEG digitale non consentiva una registrazione del tutto affidabile o comunque rapportabile a quella derivante dagli apparecchi analogici (Collura, 1993). Questa diatriba attualmente è superata ed è riconosciuta la supremazia delle apparecchiature digitali. Infatti oggi la maggior parte degli elettroencefalografi in uso sono dei PC, fissi o portatili, dotati di software dedicati, che consentono di effettuare vari tipi di EEG (EEG standard e Video-EEG) (Fig.2).



*Figura 2. Esempio di unità di acquisizione digitale SystemPlus Evolution Micromed®. Le applicazioni si estendono dall'accertamento di morte cerebrale alla Video EEG di routine, dalla Polisonnografia fino ad arrivare alle applicazioni più impegnative, quali il Monitoraggio Prolungato dell'Epilessia-LTM e la Stereo-EEG.*

Superate le iniziali ritrosie quindi, si è dovuto riconoscere che l'EEG digitale ha indubbiamente notevoli vantaggi rispetto all'elettroencefalografia tradizionale, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di archiviazione, di revisione e di riformattazione "off-line" del materiale registrato. Inoltre la digitalizzazione dei tracciati, grazie alla possibilità di loro trasmissione via rete, permette la refertazione a distanza e un più facile scambio di pareri tra colleghi.

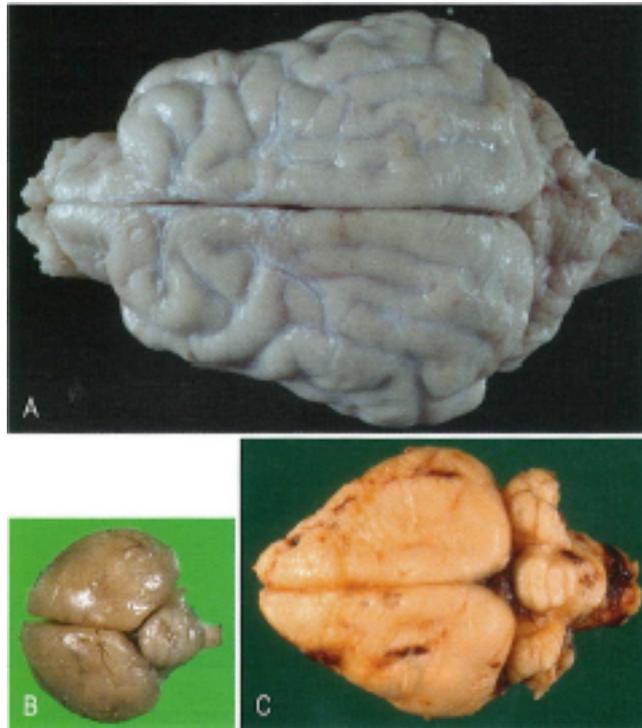
A distanza di quasi ottant'anni dalla pubblicazione del primo report di Hans Berger, si può dire che l'elettroencefalografia, sia come branca diagnostica sia come tecnica neurofisiologica di utilizzo in campo sperimentale, conserva integro il suo interesse e la sua utilità. In medicina veterinaria le prime utilizzazioni a scopo sperimentale della tecnica EEG si devono a Wikler e Atschul (1950), Shalke e Walz (1954), Charles e Fuller (1955). I primi tentativi d'impiego dell'EEG nella routine clinica del cane sono del medico Brass, cui seguirono Croft (1962), Florio e Laprass (1963) e in Italia Venturelli

(1962) (85). Se è vero che i fondamentali pattern EEG fisiologici e patologici furono già stati descritti a grandi linee nel ventennio fra il 1940 e il 1960, negli anni successivi, proprio grazie all'evoluzione tecnologica, grandi passi in avanti si sono compiuti riguardo l'acquisizione e l'elaborazione del segnale bioelettrico registrato.

L'avvento delle neuroimmagini (TC e RM), sia in medicina umana che in medicina veterinaria, ha sicuramente permesso di avere a disposizione mezzi diagnostici potenti e ormai insostituibili e l'EEG ha cambiato ruolo diventando un test diagnostico complementare di screening. Ad ogni modo non si può negare che l'EEG conserva tuttora il ruolo di esame neurofunzionale cardine per la valutazione delle funzioni cerebrali (Bergamasco, 1999).

## 2.2 Cenni di anatomia e fisiologia del Sistema Nervoso Centrale

Il sistema nervoso centrale comprende diverse strutture: il midollo spinale, il tronco dell'encefalo (bulbo, ponte e mesencefalo), il cervelletto, il diencefalo e il telencefalo (nuclei della base, sostanza bianca e corteccia cerebrale). Il telencefalo è suddiviso in due emisferi da un profondo solco, la scissura interemisferica. Ciascun emisfero è a sua volta suddiviso dalle scissure in lobi: frontale, parietale, temporale, occipitale. Nell'ambito di ciascun lobo, infine, i solchi delimitano le circonvoluzioni (Nieuwenhuys, 2008a). Le circonvoluzioni permettono di estendere l'area corticale a parità di volume. La presenza delle circonvoluzioni encefaliche è presente nelle specie di interesse veterinario più evolute, mentre in roditori, lagomorfi, uccelli e alcuni marsupiali non sono presenti (Fig. 3) (Thomson, 2012).



*Figura 3. Anatomia comparata del cervello di cane (A), uccello (B) e coniglio (C). Notare l'assenza di circonvoluzioni corticali negli uccelli e nei conigli rispetto al cervello di cane. Foto tratta da Veterinary Neuroanatomy, Thomson C., Hahn C., Ed. Saunders Elsevier, 2012.*

Sulla base delle caratteristiche cito-architettoniche la corteccia cerebrale si organizza in senso rostro-caudale in sei strati: lo strato plessiforme o molecolare; lo strato delle piccole cellule piramidali o granulare esterno; lo strato delle medie e grandi cellule piramidali; quello granulare interno; quello delle cellule piramidali giganti; lo strato delle cellule polimorfe o fusiformi ed infine da cellule gliali. I neuroni del IV strato della corteccia cerebrale (particolarmente ricco di cellule granulari) ricevono le afferenze sottocorticali (talamiche) e trasmettono tali segnali ai neuroni degli strati II, III, V e VI, da cui partono le efferenze; in particolare, le cellule piramidali proiettano sia ad altre aree della corteccia sia a strutture sottocorticali.

Le cellule piramidali prendono questo nome dalla loro particolare forma. Queste tendono a essere maggiormente presenti a livello della circonvoluzione precentrale, andando poi progressivamente a diminuire nella corteccia frontale, parietale, polare

(frontale e occipitale) e quindi nelle aree sensitive. Le cellule piramidali hanno un corpo cellulare di volume variabile, con l'apice rivolto verso la superficie della corteccia.

Dal polo superficiale origina un dendrite apicale che giunto in vicinanza della superficie della corteccia si divide in ciuffi. Dal polo profondo, slargato, si distaccano, invece, diversi dendriti basali che si ramificano orizzontalmente (Nieuwenhuys, 2008b; Swanson, 2012a).

Le cellule della glia, che rappresentano l'ultimo strato della corteccia, molto più numerose dei neuroni, possono essere di vario tipo (astrociti, oligodendrociti, microglia, cellule ependimali ecc.) ed hanno una funzione trofica e di sostegno nei confronti dei neuroni.

I neuroni, cellule eccitabili capaci di trasmettere informazioni sotto forma di potenziali elettrolitici, sono costituiti dal corpo cellulare (o pirenoforo), e da due tipi di prolungamenti citoplasmatici: i dendriti, parte recettiva della cellula nervosa e l'assone, che trasmette gli impulsi fino alla sua ramificazione terminale. Le caratteristiche anatomico-funzionali dei neuroni permettono all'organismo di avere reazioni agli stimoli provenienti dall'ambiente esterno e interno trasformandoli in impulsi nervosi, inoltre ne permettono la loro trasmissione ad altre parti della stessa cellula nervosa o ad altri neuroni.

L'assone prende anch'esso origine dal polo profondo del corpo cellulare, oppure da uno dei dendriti basali e, dopo aver attraversato gli strati sottostanti della corteccia ed essersi munito di guaina mielinica, abbandona la corteccia cerebrale entrando a far parte dei fasci di proiezione o di associazione. Poco dopo l'origine l'assone delle cellule piramidali distacca un ramo collaterale ricorrente che si mette in sinapsi con le cellule associative, che riverberano sulle cellule piramidali stesse, in un circuito di tipo inibitorio. Gli assoni delle cellule piramidali più voluminose costituiscono fibre di proiezione dirette alle formazioni grigie sottocorticali o fibre di associazione, lunghe

o brevi. Gli assoni delle cellule piramidali più piccole possono decorrere orizzontalmente nell'ambito della corteccia, oppure risalire verso la superficie. Gli assoni della maggior parte delle cellule non piramidali terminano localmente. Ciascuna cellula piramidale rappresenta un'unità colonnare, ovvero, un modulo funzionale elementare della corteccia, che si estende per tutto lo spessore della corteccia stessa e prende connessioni complesse con altre cellule piramidali, con cellule associative e con fibre di proiezione afferenti (Swanson, 2012b).

Ogni cellula nervosa è dotata di una membrana cellulare che funziona come un filtro selettivo, estremamente sottile (0,005  $\mu\text{m}$  di spessore) e consiste in due strati di fosfolipidi. Sulla membrana cellulare sono localizzati recettori specifici per determinate sostanze chimiche (esogene ed endogene) e canali specifici per il passaggio di ioni con cariche elettriche positive ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) o negative ( $\text{Cl}^-$ ). Tali canali possono essere aperti o chiusi da peculiari modificazioni biochimiche a carico della membrana stessa.

I canali voltaggio-dipendenti posti sulla membrana cellulare presinaptica svolgono una duplice funzione: depolarizzare la membrana presinaptica e quindi innescare il potenziale d'azione e produrre una corrente di intensità tale da generare una variazione di potenziale anche nella cellula postsinaptica (per realizzare ciò è necessario che la terminazione presinaptica sia di dimensioni maggiori rispetto alle terminazioni postsinaptiche).

Tutte le cellule nervose, piramidali e non, stabiliscono connessioni interneuronali attraverso le sinapsi che si possono realizzare a livello del corpo cellulare, dei dendriti e dell'assone. La trasmissione sinaptica può essere elettrica o chimica.

Nel caso delle sinapsi elettriche esiste una continuità citoplasmatica fra la terminazione presinaptiche e postsinaptiche (gap junction). La trasmissione nervosa attraverso le sinapsi elettriche è molto rapida perché è il risultato di un passaggio diretto nella cellula postsinaptica della corrente generata dai canali voltaggio-

dipendenti della cellula presinaptica, con un ritardo virtualmente assente. Le sinapsi elettriche interconnettono spesso intere popolazioni di neuroni e, in questi casi, la funzione è sincronizzare le loro risposte. Quando le cellule connesse mediante sinapsi elettriche sono molteplici, la soglia necessaria per evocare un potenziale d'azione diviene elevata. Se tuttavia tale soglia viene superata, tutto il gruppo dei neuroni accoppiati elettricamente tenderà a scaricarsi in maniera sincrona e massimale, del tipo tutto o nulla. Le sinapsi che mettono in comunicazione le cellule piramidali sono elettriche e si comportano come delle semplici resistenze, la cui trasmissione elettrica permette la scarica rapida e sincrona di due o più cellule interconnesse.

Nel caso delle sinapsi chimiche la terminazione neuronale presinaptica è separata dalla membrana postsinaptica dal vallo sinaptico; in esse si realizza una distanza inter-sinaptica di 30-50 nm e un ritardo sinaptico che varia da 0,3 a diversi ms. Il potenziale elettrico generatosi nella terminazione assonale determina la liberazione di un neuromediatore chimico da parte delle vescicole presinaptiche, che si diffonde nel vallo sinaptico e, agendo su specifici recettori, determina l'apertura di particolari canali ionici cui conseguono modificazioni del potenziale di membrana postsinaptico (Aguggini, 1994).

I potenziali postsinaptici potranno essere eccitatori o inibitori, secondo il neuromediatore liberato. L'azione di un neurotrasmettitore sull'elemento postsinaptico non dipende tanto dalla struttura chimica del neurotrasmettitore, quanto piuttosto dalle proprietà dei recettori con i quali il neurotrasmettitore si lega: l'acetilcolina è quasi sempre un trasmettitore eccitatorio; la noradrenalina, la dopamina e la serotonina possono essere eccitatorie o inibitorie.

Il principale neuromediatore inibitorio del SNC è l'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA); i recettori post sinaptici di questo neurotrasmettitore formano canali permeabili agli ioni  $\text{Cl}^-$ . L'attivazione di tali canali determina l'ingresso di ioni  $\text{Cl}^-$  che iperpolarizzano la membrana dei neuroni e ne aumentano la conduttanza a riposo. Di conseguenza,

l'apertura di questi canali è in grado di cortocircuitare le correnti eccitatorie che entrano nella cellula.

Il principale neurotrasmettitore eccitatorio è invece il glutammato (Glu), di cui sono stati identificati vari tipi di recettori postsinaptici, fundamentalmente rappresentati dai recettori AMPA (acido  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico), e dai recettori NMDA (N-metil-D-aspartato). I recettori AMPA formano canali permeabili sia agli ioni  $\text{Na}^+$  che  $\text{K}^+$  e i flussi ionici che passano attraverso questi canali sono responsabili della fase precoce di un potenziale postsinaptico eccitatorio veloce. Il recettore NMDA forma un canale che è permeabile agli ioni  $\text{Ca}^{++}$ , oltre che agli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; questo complesso recettore-canale è anche sensibile al voltaggio. In condizioni di riposo il canale è bloccato dagli ioni  $\text{Mg}^{++}$  extracellulari e l'accesso al canale si libera soltanto in seguito a una depolarizzazione. Perciò, per aprire il canale NMDA, non basta la presenza del Glu ma è necessaria anche una depolarizzazione. Dato il ritardo con cui si apre questo canale, i flussi ionici che lo attraversano determinano la comparsa di una componente tardiva del potenziale eccitatorio postsinaptico (March, 1998).

Le sinapsi eccitatorie sono in genere localizzate sui dendriti, mentre le sinapsi inibitorie si trovano principalmente sul corpo cellulare dove sono in grado di contrastare efficacemente gli effetti delle afferenze eccitatorie che possono arrivare dall'assone e dai dendriti.

L'integrazione finale delle afferenze sinaptiche viene fatta a livello del cono d'emergenza dell'assone che è la zona del corpo cellulare più vicina al segmento iniziale dell'assone stesso. Questa zona possiede la densità più elevata di canali  $\text{Na}^+$  di tutta la cellula e perciò avrà anche la soglia più bassa per l'innescamento di un potenziale d'azione (Aguggini, 1994).

Le cellule nervose comunicano tra di loro attraverso contatti sinaptici diretti o mediati e l'impulso elettrico si genera e si trasmette grazie all'ingresso o all'uscita di

ioni con cariche elettriche positive o negative. All'interno della cellula in condizioni di riposo la concentrazione di ioni  $K^+$  è circa 30-50 volte più grande che all'esterno mentre gli ioni  $Na^+$ , sempre in condizioni di riposo, sono 10 volte più concentrati all'esterno che all'interno. Le concentrazioni dei vari ioni sono mantenute stabili da un meccanismo attivo di pompa ionica e in condizioni di riposo i canali per gli ioni  $K^+$  sono aperti e quelli per gli ioni  $Na^+$  chiusi.

Oltre che dal gradiente di concentrazione creato dalla pompa  $Na^+ / K^+$ , il potenziale di membrana dipende anche dalla facilità con cui gli ioni  $K^+$  riescono a penetrare attraverso la membrana (permeabilità elevata) e, al contrario, dalla bassa permeabilità della membrana stessa in condizioni di riposo per gli ioni  $Na^+$ . In condizioni basali quindi all'interno della cellula è presente un potenziale di riposo equivalente a una differenza di potenziale rispetto all'esterno di circa  $-70$  mV. Quando si verifica in modo drammatico un ingresso di ioni  $Na^+$  all'interno della cellula, che non riesce a essere compensato dall'uscita di ioni  $K^+$ , si genera il cosiddetto potenziale d'azione (action potential, AP) che raggiunge valori positivi di circa  $30$  mV (depolarizzazione). A questo punto i meccanismi di compenso permettono un blocco dell'ingresso di  $Na^+$  e una fuoriuscita massiccia di ioni  $K^+$  accompagnata a ingresso di ioni  $Cl^-$ , con ritorno alle condizioni basali (iperpolarizzazione). Il potenziale d'azione si genera in  $1$  ms, la ripolarizzazione avviene in  $2-3$  ms. Immediatamente dopo la genesi di un potenziale d'azione la membrana è refrattaria ad altre stimolazioni, inizialmente in modo assoluto poi in modo relativo (innalzamento della soglia di eccitabilità).

Modifiche della concentrazione di cariche elettriche tra interno ed esterno della cellula, meno drammatiche di quelle che determinano il potenziale d'azione, sono alla base di altre differenze di potenziale. I neurotrasmettitori eccitatori possono rendere la membrana neuronale altamente sensibile agli ioni  $Na^+$  per  $1-2$  ms. Durante questo breve lasso di tempo gli ioni  $Na^+$  entrano all'interno della cellula

riducendo la negatività del potenziale di riposo di 1-5 mV e realizzando un potenziale postsinaptico eccitatorio (excitatory postsynaptic potential, EPSP) che impiega circa 15 ms per scomparire del tutto. Al contrario i neuromediatrici inibitori possono determinare un aumento del potenziale di riposo (-70 mV) fino a valori di circa -75 mV consentendo l'ingresso nella cellula di ioni Cl<sup>-</sup> e la fuoriuscita di ioni K<sup>+</sup>: si realizzerà così il potenziale postsinaptico inibitorio (inhibitory postsynaptic potential, IPSP) che persisterà anch'esso per circa 15 ms (Speckmann, 2005 cap 2).

### 2.3 Neurofisiologia dell'attività elettrica cerebrale

L'elettroencefalogramma (EEG) consiste nella registrazione dell'attività bioelettrica cerebrale dalla superficie del cranio. Per definizione, i potenziali elettroencefalografici di superficie (o cutanei) possono essere considerati come la propagazione dei field potentials (potenziali di campo) prodotti dalle fluttuazioni positive e negative dell'attività elettrica di ampie popolazioni di neuroni corticali attraverso i tessuti del cranio. I flussi di corrente extracellulare che producono i potenziali di campo sono generati a loro volta dalla sommazione spaziale dei potenziali postsinaptici delle singole cellule attivate in una determinata area delle circonvoluzioni corticali (Speckmann, 2005b).

L'EEG è la rappresentazione grafica della differenza di potenziale elettrico registrata tra un elettrodo "attivo" (esplorante), posto in prossimità della sede dove si svolge l'attività neuronale, e un elettrodo di riferimento collocato a una certa distanza dal primo. In alcune configurazioni bipolari gli elettrodi possono essere entrambi attivi, o influenzati dall'attività elettrica cerebrale, mentre nelle derivazioni monopolari solo un elettrodo è esplorante mentre quello di riferimento non ne è influenzato.

L'EEG di superficie misura quindi la differenza di potenziale tra diverse aree dello scalpo e la sua ampiezza è proporzionale all'intensità del campo elettromagnetico

che si forma nella corteccia cerebrale durante l'attivazione sinaptica dei dendriti di molti neuroni piramidali posti proprio al di sotto della superficie del cranio.

Sebbene i potenziali d'azione generati dai neuroni piramidali possano sembrare la fonte primaria dei potenziali elettrici registrati sul cranio, di fatto essi contribuiscono poco alla genesi dei tracciati EEG. Il contributo principale invece è dato dai potenziali elettro-clinici sinaptici neuronali. I primi non possono essere i responsabili principali della genesi dell'EEG per due motivi sostanziali: primo, l'ampiezza del campo elettrico prodotto dalla propagazione di un potenziale d'azione diminuisce molto più rapidamente dell'ampiezza dei campi prodotti dai potenziali postsinaptici; secondo, la durata dei potenziali d'azione è molto breve, dell'ordine di 1 ms, tempo insufficiente per ottenere un'adeguata sincronizzazione di ampie popolazioni neuronali corticali (anche una minima asincronia di pochi millisecondi renderebbe quindi impossibile il sommarsi dei potenziali d'azione).

I flussi di correnti sinaptiche nello spazio extracellulare durano invece da 10 a 40 ms, quindi, anche in assenza di una perfetta sincronizzazione, i potenziali postsinaptici possono sommarsi più efficacemente dei potenziali d'azione e creare campi elettrici propaganti abbastanza ampi da poter essere registrati sulla cute.

Il potenziale postsinaptico, eccitatorio o inibitorio, possiede inoltre altre peculiarità che lo distinguono dal potenziale d'azione: non ha un valore soglia sopra il quale si attiva; è graduato, ovvero la sua ampiezza è proporzionale alla grandezza dello stimolo e pertanto non obbedisce alla legge del tutto o nulla, come invece succede per il potenziale d'azione; è un potenziale locale e non ha tendenza a propagarsi senza decremento, ma diminuisce a mano a mano che ci si allontana dalla sua sorgente (Rotterdam, 2005).

Un elemento di fondamentale importanza nella tecnica elettroencefalografica è la sincronizzazione delle cellule corticali. I tessuti biologici non sono buoni conduttori e quindi i campi elettrici si attenuano con l'aumento della distanza tra l'evento

biologico e l'elettrodo registrante. Questo fenomeno dipende anche dalla diffusione spaziale e dall'orientamento del generatore. Più i neuroni di una popolazione sono orientati in parallelo e attivi in modo sincrono e maggiore è l'ampiezza del segnale registrato a distanza. Per comprendere meglio l'importanza della sincronizzazione di un grande numero di cellule corticali nella genesi dell'EEG basta tenere in mente che il contributo "elettrico" di ciascun neurone corticale è straordinariamente piccolo e che il segnale deve comunque attraversare diversi strati di vari tessuti corporei, incluse meningi, liquor, ossa del cranio e sottocute. Ognuno di questi strati si comporta come un volume conduttore con una conduttività e una suscettibilità tra loro differenti, quindi il potenziale elettrico subirà notevoli attenuazioni prima di raggiungere gli elettrodi posizionati nel sottocute. Di conseguenza, sono necessari migliaia di neuroni attivati contemporaneamente per generare un segnale EEG abbastanza grande da poter essere rilevato. Infatti per determinare un segnale EEG visibile in superficie è necessaria l'attivazione sincrona di oltre 100 neuroni corticali, compresi in un'area di almeno  $6 \text{ cm}^2$ . Questo ha un'interessante conseguenza riguardo all'ampiezza del segnale EEG che dipende proprio da quanto è sincronizzata l'attività dei neuroni implicati. Difatti, se ciascuna cellula riceve la stessa quantità di eccitazione, ma in tempi diversi, i segnali sommati risultano esigui e irregolari. Se tutte le cellule ricevono, invece, la stessa eccitazione contemporaneamente, i singoli segnali possono sommarsi, dando origine a un campo elettrico più intenso. In questo caso il numero di cellule attivate e la quantità totale di attivazione possono rimanere invariate, ciò che cambia è solo la sincronizzazione dell'attività. Se l'eccitazione sincrona di questo gruppo di cellule si ripete molte volte, l'EEG che ne deriva sarà costituito da onde ampie e ritmiche (Fig. 4) (Rotterdam, 2005; Tatum, 2008a).

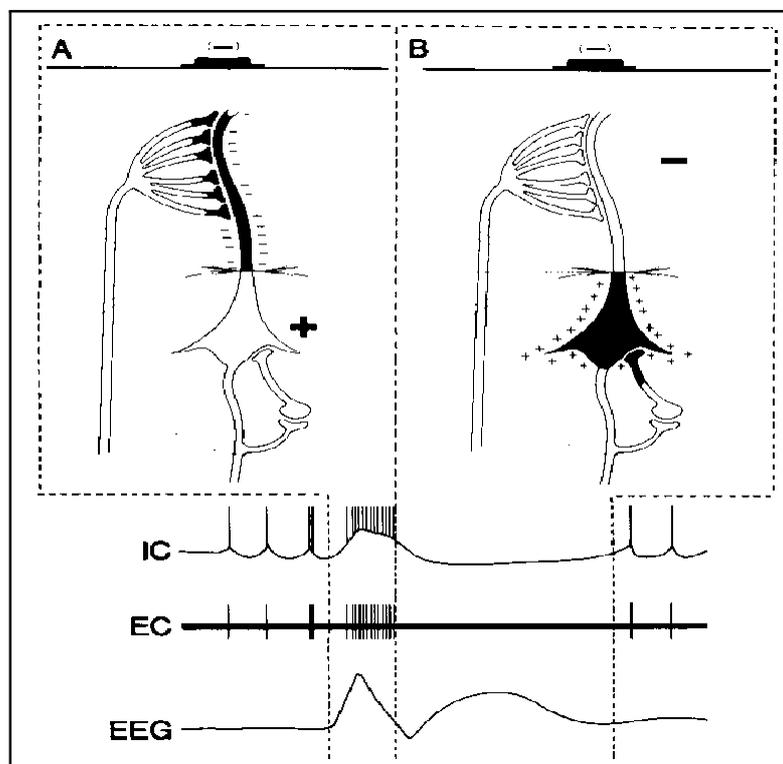


Figura 4 Generazione di uno spike. A) Input eccitatorio, il  $Ca^{++}$  entra nella cellula B) Propagazione dell'impulso lungo l'assone fino al soma neuronale. Nei grafici sotto le figure A e B vengono rappresentati in funzione del tempo i potenziali intracellulari (IC), extracellulari (EC) ed il tracciato EEG registrato sul cranio. Immagine tratta e modificata da Fisch, 1999.

Nonostante l'intrinseca capacità della corteccia di generare un'attività elettromagnetica sincronizzata, è indiscutibile il ruolo fondamentale che il talamo riveste nel determinare la ritmicità del segnale EEG, intesa come comparsa di sequenze di onde ricorrenti a intervallo regolare, di forma e durata simile. In condizioni normali i nuclei talamici (in particolare quelli del talamo dorsale) interagiscono con la corteccia nel determinismo della sincronizzazione dei potenziali post-sinaptici, in condizioni sia di veglia sia di sonno. Secondo la teoria del pace maker facoltativo i neuroni del fascio talamo-corticale inviano connessioni sia alla corteccia sia agli interneuroni inibitori talamici, realizzando un meccanismo di biofeedback. La teoria reticolare attribuisce invece le proprietà di pace maker regolatorio al nucleo

reticolare talamico, da cui si dipartono vie inibitorie, dirette sia verso il talamo dorsale sia verso il tronco rostrale, con funzione depolarizzante (Fig. 5) (Steriade, 2005).

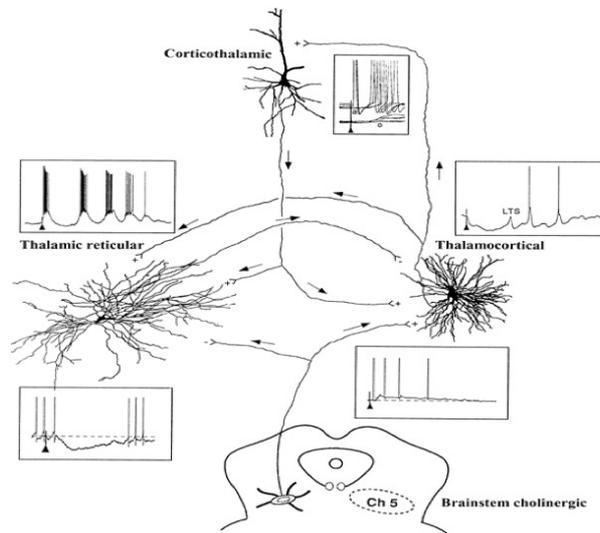


Figura 5. Schema dimostrativo delle interconnessioni talamo-corticali e talamo-reticolari. Figura tratta da Steriade, 2005.

Il fenomeno EEG che da un punto di vista semeiologico meglio evidenzia la connessione funzionale esistente tra talamo e corteccia è rappresentato dai fusi (spindles) del sonno. In questo caso i neuroni GABAergici del nucleo reticolare talamico scaricano ritmicamente sui neuroni del fascio talamo-corticale che a loro volta proiettano diffusamente sui neuroni corticali. Quest'attività si traduce in EPSPs ipersincroni di vaste popolazioni neuronali corticali che divengono molto ben visibili all'EEG di superficie. Nonostante la vasta letteratura scientifica al riguardo, il talamo sembra essere invece molto meno coinvolto nella genesi del ritmo alfa che, com'è noto, in veglia quieta costituisce l'attività posteriore dominante. Il ritmo alfa infatti risente sì delle connessioni talamo-corticali ma probabilmente ha come principali generatori specifiche aree corticali. Anche le attività EEG più rapide (di frequenza beta e gamma) sono prodotte fondamentalmente da generatori corticali (Fig. 6).

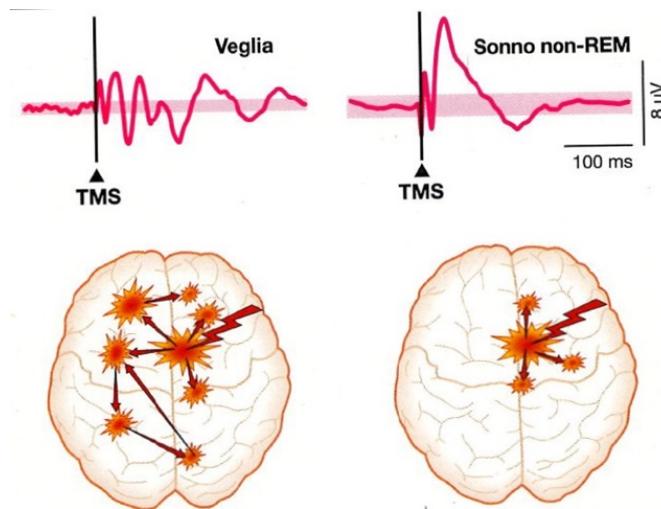


Figura 6. A sinistra è riportato un tipico tracciato di un soggetto in stato di veglia; a destra il tracciato tipico del sonno non-REM.

Altrettanto importanti infine sono i fenomeni EEG caratterizzati da desincronizzazione del segnale, intesa come interruzione dell'attività oscillatoria ritmica. La formazione reticolare tronco-encefalica (nuclei del raphe e locus coeruleus) e l'ipotalamo posteriore hanno funzioni desincronizzanti sulla corteccia cerebrale. In questo caso l'attività ritmica può essere interrotta sia per azione diretta sui neuroni corticali sia indirettamente sui neuroni talamici (Steriade, 2005).

Classicamente le onde EEG che possono essere riscontrate nell'attività di fondo normale (background activity, ongoing activity), visualizzabili qualitativamente o in modo più preciso mediante l'ausilio di programmi specifici per l'analisi quantitativa, sono le seguenti: banda delta ( $\delta$ , <4 Hz); banda theta ( $\theta$ ), 4-7,5 Hz); banda alfa ( $\alpha$ , 8-12,5 Hz); banda beta ( $\beta$ , > 13-30 Hz) (Fig. 7).

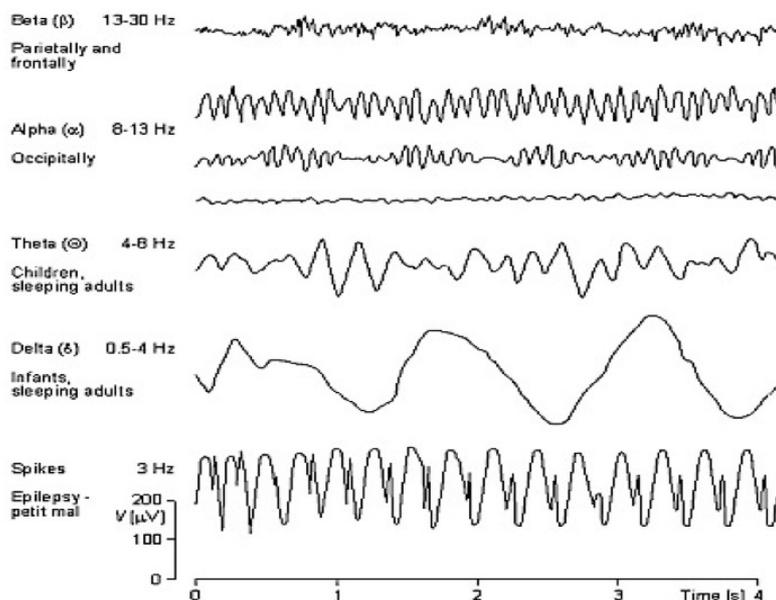


Figura 7. Esempio di tutte le possibili frequenze riscontrabili in un tracciato EEG. Vengono riportati range di frequenza e loro rappresentazione grafica schematica.

La banda delta (che raggruppa le frequenze EEG più lente) è quella che più frequentemente risulta inquinata da oscillazioni artefattuali. In generale l'attività delta nell'EEG fisiologico di veglia dell'adulto è poco valorizzabile a occhio, essendo invece caratteristica e molto più rappresentata nel sonno lento. La banda theta venne così definita da Grey Walter che l'associò per primo alla presenza di tumori talamici (Walter, 1944). Comunque, sia nell'uomo che nel cane, quando nell'EEG di veglia di un adulto si assiste a una progressiva scomparsa dell'alfa sostituito da attività theta si deve subito pensare a una riduzione del livello di vigilanza (addormentamento). La banda alfa (8-12,5 Hz) è propria dell'EEG di veglia e le caratteristiche di quello che classicamente è definito il fisiologico ritmo di fondo alfa. L'attività beta è correlata a processi mentali e cognitivi di vario tipo, all'ansia e allo stato di allerta, ma è anche indotta e incrementata dalla sonnolenza e dal sonno leggero (Fig. 8).

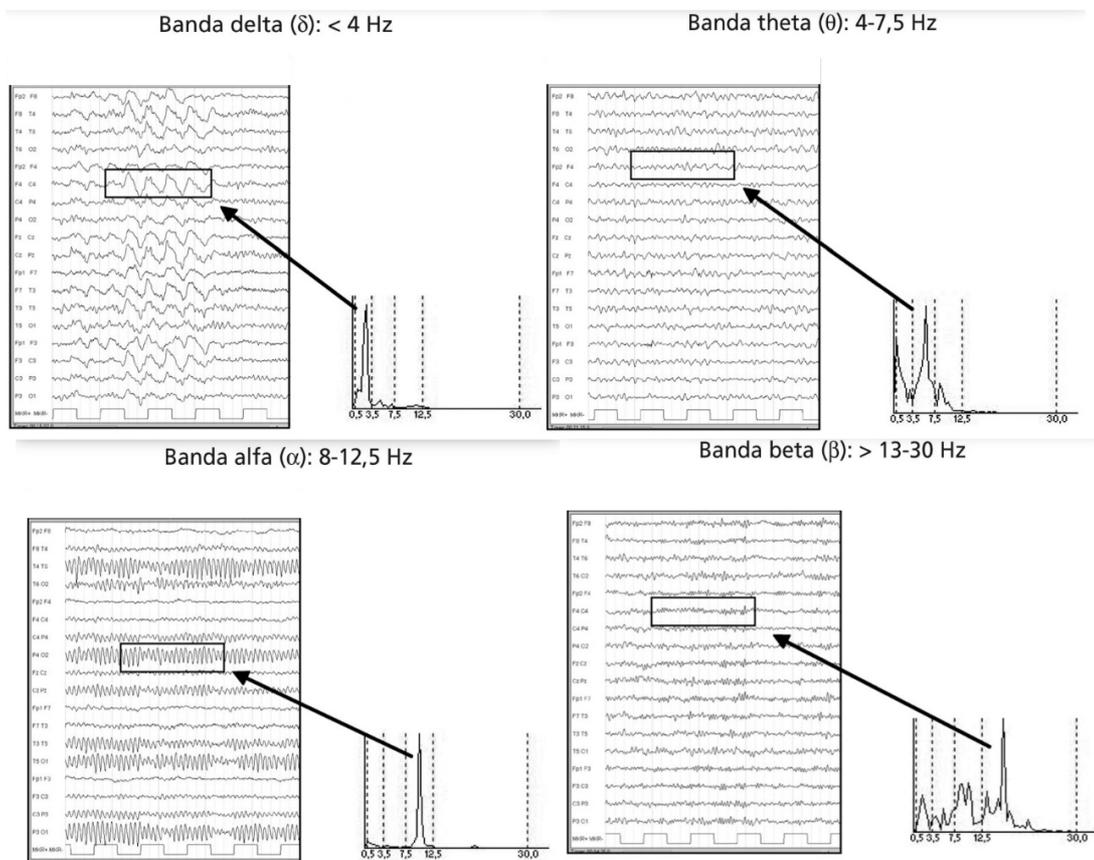


Figura 8. Rappresentazione grafica multimodale (tracciati e spettri) delle principali quattro bande EEG. Alla destra di ogni tracciato viene riportata l'analisi quantitativa delle frequenze. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Fuori del dominio della banda beta le frequenze ancora più rapide sono definite come appartenenti alla banda gamma ( $\gamma$ , 30-80 Hz), frequenze che normalmente non vengono nemmeno visualizzate negli EEG di routine perché eliminate dagli appositi filtri. Negli ultimi anni inoltre, grazie soprattutto all'avvento di una tecnologia digitale sempre più sofisticata e in particolare per interessi sperimentali, si sta prestando grande attenzione alle bande di frequenza ultrafast ( $> 80$  Hz) (Vanhatalo, 2005).

## 2.4 Origine delle onde cerebrali

In linea generale, l'attività elettrica generata da un dipolo provoca onde di attivazione che si propagano con una determinata grandezza in una determinata direzione e che per convenzione sono dirette dalla zona elettropositiva alla zona elettronegativa.

Mentre la grandezza del vettore è in funzione della distanza dell'elettrodo registrante (nei segnali bioelettrici cerebrali la potenza del segnale è inversamente proporzionale al quadrato della distanza), la direzione del vettore rimane sempre costante. In altre parole è possibile affermare che più gli elettrodi registranti sono distanti dall'evento bioelettrico più sarà piccolo il potenziale registrato. Inoltre se due o più vettori sono orientati simultaneamente verso lo stesso elettrodo, potranno essere sommati. In sintesi, il risultato di questa somma corrisponderà alla somma aritmetica delle loro grandezze solo nel caso in cui essi agiscano nella stessa direzione. Il fatto che i neuroni piramidali siano disposti parallelamente fa sì che il campo elettrico generato da ognuno di loro possa sommarsi se vengono attivati simultaneamente (Niedermeyer, 2005a).

Quindi l'orientamento del dipolo, e quindi del vettore che rappresenta il flusso di corrente generato, è estremamente importante. In base all'orientamento del dipolo rispetto alla superficie corticale, si distingueranno un dipolo verticale (o radiale) se orientato verticalmente alla superficie corticale, un dipolo orizzontale (o tangenziale) se localizzato in un solco o in una scissura interemisferica e un dipolo obliquo se estremità positiva ed estremità negativa non risultano allineate. Il diverso orientamento del dipolo genererà sullo scalpo situazioni elettriche diverse.

Se sulla superficie dello scalpo si applicano due elettrodi, questi possono raccogliere tali differenze di potenziale. L'ampiezza del segnale è in funzione della distanza tra i due elettrodi, essendo tanto maggiore quanto più sono distanti gli elettrodi tra loro. Questo fenomeno viene spiegato dal Teorema di Gauss il quale afferma che il flusso

del campo elettrico attraverso una superficie chiusa dipende solo dalle cariche interne alla superficie stessa ed è direttamente proporzionale all'angolo solido generato. L'angolo solido è un'estensione del concetto di angolo piano, ed è definito come ciascuna delle semirette passanti per uno stesso punto (nel nostro caso il punto in cui si genera il campo elettrico) e per i punti di una curva chiusa semplice tracciata su di una superficie non contenente il vertice (nel nostro caso i due punti dello scalpo dove si applicano gli elettrodi). Quindi applicando i principi del Teorema di Gauss tanto maggiore sarà l'angolo solido, e quindi la distanza fra gli elettrodi sullo scalpo, tanto maggiore sarà la superficie e il flusso di cariche elettriche registrate (Rotterdam, 2005).

In sintesi, sembra che la produzione delle onde elettroencefalografiche sia basata sulla somma dei cambiamenti di potenziale che derivano da cellule corticali, dai loro dendriti e dalle loro sinapsi e che queste strutture siano controllate da strutture più profonde (talamo, sostanza reticolare) che probabilmente agiscono da "pacemaker", accordandosi con lo stato fisiologico dell'animale (James, 2014 Introduction).

## 2.5 Posizionamento degli elettrodi: "Sistema internazionale 10-20"

Quando Hans Berger registrò il primo EEG della storia dal cranio di un essere umano aveva a disposizione due soli elettrodi, che furono posizionati nella zona anteriore e posteriore del capo. Berger continuò a utilizzare quel metodo per molti anni e lo considerava valido per misurare l'attività corticale globale. In seguito altri ricercatori evidenziarono come in realtà l'attività EEG variava in modo significativo a seconda della zona del cranio da cui si registrava (Klemm, 1968).

Il rapido proliferare di esperienze sia cliniche sia sperimentali permise in pochissimi anni di scoprire che determinati ritmi, come per esempio il fondamentale ritmo alfa, possedevano una vera e propria regionalizzazione (maggiore espressione in sede

posteriore) e che altri grafoelementi fisiologici caratteristici, come per esempio i fusi del sonno, si potevano evidenziare solo posizionando degli elettrodi in sede centrale (Kamp, 2014).

L'osservazione di attività di tipo diverso incoraggiò l'uso di molteplici elettrodi e di più canali di registrazione, ma ben presto si rese anche necessaria una standardizzazione delle metodiche di registrazione affinché i dati fossero raffrontabili tra di loro. Un apposito comitato della Federazione Internazionale delle Società di Elettroencefalografia e Neurofisiologia Clinica (International Federation of Societies for EEG and Clinical Neurophysiology, IFSECN) guidato da H. Jasper si mise al lavoro per studiare un sistema specifico di posizionamento degli elettrodi, da utilizzare in tutti i laboratori. Tale sistema, presentato al 2° Congresso Internazionale di Parigi nel 1949 e pubblicato da Jasper nel 1958, è tuttora universalmente utilizzato ed è noto sotto il nome di Sistema Internazionale 10-20 (SI10-20) (Jasper, 1958).

Gli obiettivi del SI 10-20 erano quelli di stabilire le posizioni degli elettrodi sullo scalpo con un sistema di misurazione che tenesse conto di punti di repere anatomici ben definiti, facendo sì che le misure stesse fossero proporzionali alla dimensione e alla forma del cranio; garantire con gli elettrodi un'adeguata "copertura" di tutta la testa e identificarli secondo posizioni standard, indipendentemente dal fatto che tutti o solo alcuni di essi fossero utilizzati in una determinata registrazione; identificare le posizioni degli elettrodi in base all'area cerebrale sottesa (frontale, centrale, temporale, parietale e occipitale) piuttosto che designarli con soli numeri, in modo da rendere la comunicazione più immediata e intuitiva; effettuare studi anatomici appropriati per identificare con sicurezza la proiezione delle aree corticali che presumibilmente corrispondono alle posizioni standard degli elettrodi (Reilly, 2014). Per posizionare in modo corretto gli elettrodi sullo scalpo secondo il SI 10-20 occorre tracciare delle linee ideali, a partire da particolari punti di repere anatomici. Lungo la linea mediana antero-posteriore, che congiunge il nasion all'inion, passando per il

vertice, si individuano 5 posizioni standard denominate frontopolare (Fpz), frontale (Fz), centrale (Cz), parietale (Pz) e occipitale (Oz). Considerando la distanza totale in centimetri tra nasion e inion il punto Fpz e il punto Oz sono individuati al 10% della distanza totale, rispettivamente dal nasion e dall'inion. Tutti gli altri punti sono calcolati al 20% della distanza interposta tra Fpz e Oz (la denominazione 10-20 deriva proprio da questo calcolo percentuale della distanza tra gli elettrodi). Secondo la disposizione ideale l'elettrodo centrale (Cz) dovrebbe essere collocato esattamente a metà della linea tra nasion e inion (Fig. 9). La linea coronale latero-laterale congiunge i punti preauricolari di destra e di sinistra (identificati con la depressione posta all'origine dell'osso zigomatico proprio al davanti del trago) passando per il punto centrale al vertice. Su questa linea gli elettrodi temporali (T4 a destra e T3 a sinistra) devono essere posti al 10% della distanza totale, partendo dal punto preauricolare, mentre gli elettrodi centrali laterali (C4 a destra e C3 a sinistra) vanno posti al 20% dai punti temporali (T4 e T3) e dal centrale mediano (Cz) (Fig. 10).

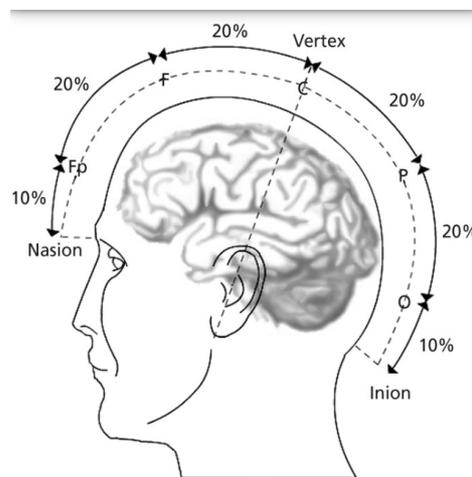


Figura 9. Rappresentazione della linea mediana anteroposteriore che congiunge nasion e inion. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

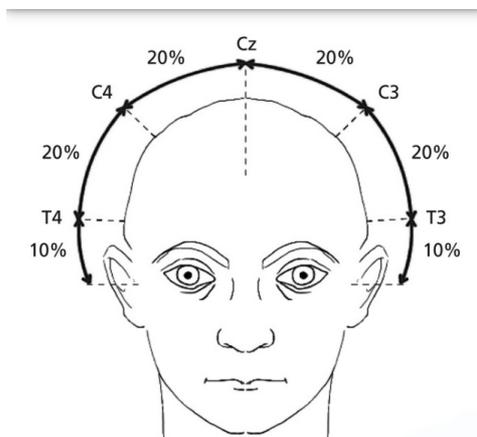


Figura 10. Rappresentazione della linea coronale laterolaterale che congiunge i punti preauricolari. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Gli elettrodi fronto-polari (denominati Fp2 a destra e Fp1 a sinistra) sono collocati lungo la linea longitudinale, al 10% della distanza lateralmente a Fpz, mentre per gli elettrodi occipitali (denominati O2 e O1) il 10% è calcolato in rapporto a Oz. Le posizioni degli elettrodi frontali inferiori (F8 e F7) e temporali posteriori (T6 e T5) sono determinate invece al 20% di questa linea partendo, rispettivamente, da Fp2 /Fp1 e O2/O1. I rimanenti elettrodi frontali (F4 e F3) e parietali (P4 e P3) sono posti lungo le linee frontali e parietali coronali, equidistanti tra la linea mediale e temporale di ogni lato. La numerazione standard del sistema 10-20 prevede la disposizione degli elettrodi di numero pari sulla parte destra del cranio e degli elettrodi di numero dispari sulla parte sinistra, indicandoli con lettere che identificano la zona del cranio sopra cui sono collocati: Fp2, F4, F8, C4, P4, T4, T6 e O2 per l'emisfero destro e Fp1, F3, F7, C3, P3, T3, T5 e O1 per l'emisfero sinistro. Un tale sistema di misurazione comporta quindi l'identificazione di 21 posizioni elettrodiche standard includendo gli elettrodi della linea mediana (Fz, Cz e Pz) e i due elettrodi auricolari di riferimento (A2 e A1) (Carpi, 2007). In medicina umana vengono utilizzati elettrodi di superficie e non elettrodi monopolari sottocutanei, come ancora avviene in veterinaria.

In veterinaria il sistema 10-20 standard sopra descritto non viene utilizzato nella sua interezza. Ci sono stati numerosi autori che hanno proposto delle variazioni a questo sistema semplificando e modificando la posizione e il numero degli elettrodi, non sempre rispettando i principi di base del sistema 10-20 (Fig 11) (Klemm, 1972; Redding, 1987; Bergamasco, 1999; Pellegrino, 2004; James, 2014). Ma nessuno di questi è stato supportato da linee guida internazionali e tale variabilità si traduce nella difficoltà di comparare studi prodotti dai diversi gruppi di ricerca.

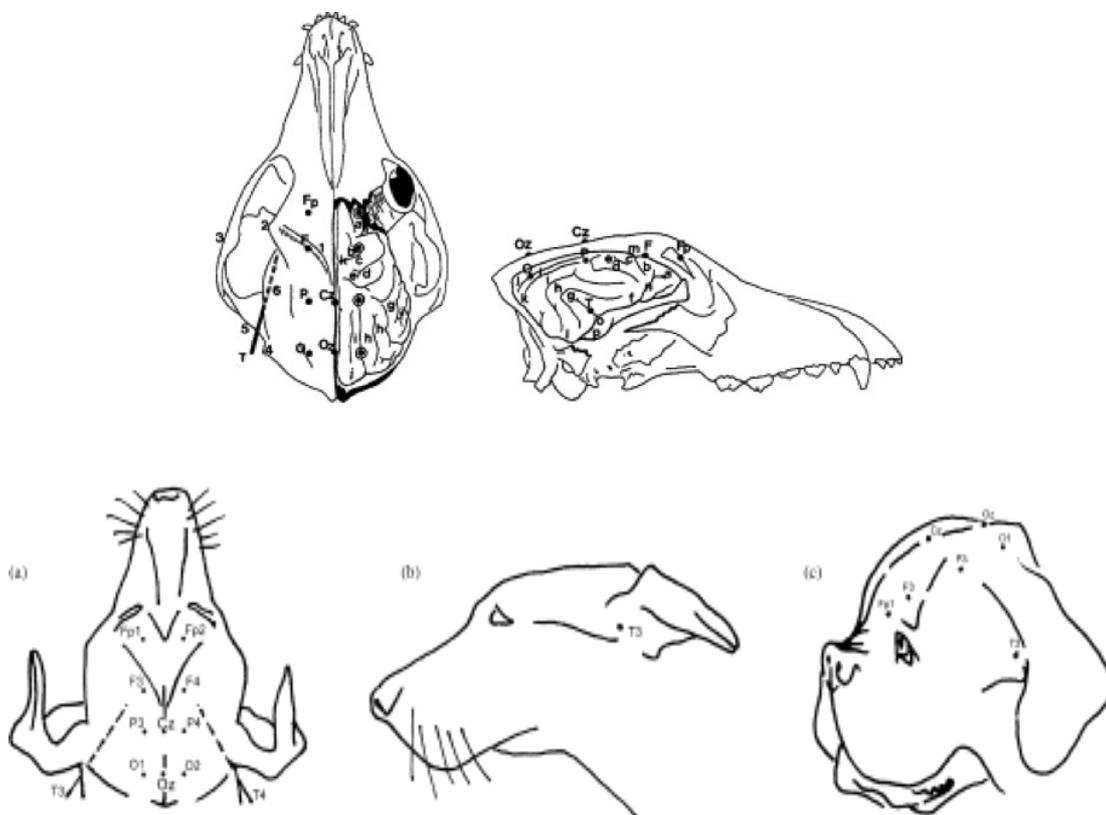


Figura 11. (A) Vista dorsale del posizionamento degli elettrodi EEG in un cranio canino mesocefalico. Fp, elettrodi frontopolarari; F, elettrodi frontali, P, elettrodi parietali; O, elettrodo occipitale; T, l'elettrodo temporale; Cz, elettrodo centrale (vertice); Oz, l'elettrodo occipitale centrale. (B) Vista laterale sinistra del cranio canino mesocefalico. L'immagine mostra il posizionamento dell'elettrodo temporale sinistro (T3). (C) Esempio di posizionamento degli elettrodi in un cranio canino brachicefalico. Foto tratta e modificata da Pellegrino, 2004.

## 2.6 Derivazioni e montaggi

Tra i molti fattori che influenzano il modo in cui il segnale bioelettrico cerebrale viene visualizzato sulla traccia EEG, sicuramente un ruolo fondamentale è svolto, oltre che dal posizionamento degli elettrodi sullo scalpo, anche da come questi sono collegati agli amplificatori differenziali. Una linea di registrazione EEG generata da un amplificatore differenziale che amplifica la differenza di segnale bioelettrico esistente fra due ingressi, viene comunemente definita "canale". Quando si misura la differenza di potenziale tra due punti del cranio uno è denominato "comune" o "di riferimento" e il suo potenziale è assunto come zero, mentre l'altro è definito "esplorante". I punti di riferimento non hanno un potenziale con valore zero reale e questo crea dei problemi che possono essere superati connettendo insieme due amplificatori al punto di terra e comparando la differenza di potenziale tra i loro ingressi attivi. Questo circuito è l'amplificatore differenziale usato negli elettroencefalografi tradizionali.

Partendo da tale premessa ne consegue che se i due ingressi (input) attivi dell'amplificatore hanno lo stesso potenziale rispetto allo stesso punto di terra, l'uscita (output) è zero. Solo quando questi potenziali sono diversi si registrerà un valore di output proporzionale alla differenza tra i due valori di input: questa proprietà degli amplificatori differenziali di non registrare segnali comuni "in fase" è estremamente importante nelle registrazioni biologiche, dove ci sono molte sorgenti di potenziali elettrici che possono interessare i due punti di registrazione in modo eguale e quindi essere "reiettati" nella registrazione (in-phase rejection). Una conseguenza di ciò è che fornendo solo l'output di un amplificatore differenziale è praticamente impossibile conoscere quale sia l'input a ognuno dei due ingressi, essendoci una infinita combinazione di input che può produrre un particolare output (Mecarelli, 2009).

Per tornare al nostro EEG può essere utile immaginare i campi elettrici sopra la superficie dello scalpo come la superficie del mare solcata da onde di varia intensità che si intersecano: l'EEG è raramente uno stagno con onde quasi impercettibili e quando ciò si verifica ci si avvicina al tracciato "piatto" e si sta per realizzare quella fatale condizione definita morte cerebrale. Continuando in questa analogia i nostri elettrodi sono come tappi di sughero galleggianti sull'acqua e noi possiamo soltanto misurare le differenze di altezza fra di loro. Da queste differenze è possibile però stabilire quanto sia esteso il pattern delle onde che le produce. Chiaramente questa ricostruzione è più facile se i "tappi" sono posizionati in un modo preciso, a distanze approssimativamente regolari, come disposti su una grata ortogonale. C'è poi bisogno di un punto fisso che potrebbe essere la riva cui tutti i tappi dovrebbero riferirsi.

In elettroencefalografia quindi, così come nella nostra analogia marinaresca, oltre il posizionamento degli elettrodi sullo scalpo (secondo il SI 10-20), sono fondamentali la combinazione degli elettrodi e la loro modalità di collegamento all'amplificatore (montaggi e derivazioni). Per ragioni storiche e pratiche l'EEG è di solito visualizzato come un insieme di tracce che indicano come si modificano le differenze di potenziale nel tempo. In un tracciato tradizionale (EEG analogico) ogni traccia è la risultante del collegamento di due elettrodi agli amplificatori e ai filtri, con successivo passaggio del segnale captato al galvanometro e alla penna scrivente. Con l'avvento dell'EEG digitale tutto è stato sostituito dall'hardware e dal software dei computer, ma ogni traccia continua a essere indicata come "canale", sia che venga prodotta da un apparecchio analogico sia che venga elaborata da un computer (Mecarelli, 2009). Il vantaggio risiede nel fatto che le varie configurazioni di montaggio e derivazioni possono essere modificate e applicate anche dopo la registrazione dell'EEG, così come accade per i filtraggi e le amplificazioni dei canali.

In medicina veterinaria sono utilizzati due tipi di derivazioni: quelle referenziali e quelle bipolari (Holiday and Williams, 1999).

Nelle derivazioni referenziali ogni elettrodo posto sul cranio viene riferito a un elettrodo comune posto in un punto x, solitamente nel dorso del naso. Il principio è analogo a quello delle mappe geografiche, dove l'altitudine di ogni punto è calcolata considerando come riferimento il livello del mare. L'elettrodo comune di riferimento dovrebbe essere il più possibile neutro dal punto di vista elettrico (non contaminato né da altri potenziali elettrici cerebrali né da potenziali biologici corporei), eventualità davvero rara nella realtà. Le attuali apparecchiature EEG digitali riferiscono sempre il segnale bioelettrico cerebrale a un elettrodo comune di riferimento che in genere nella testina-paziente ha un ingresso denominato G2 e che può essere posizionato sia sullo scalpo sia altrove (usualmente esso però viene posizionato sullo scalpo medialmente, anteriormente all'elettrodo Fz o tra Fz e Cz). Il G2 (elettrodo comune) non è altro quindi che il punto comune rispetto al quale sono misurati tutti i potenziali dei singoli elettrodi (ogni sistema, infatti, misura solo differenze di potenziale) (Mecarelli, 2009).

Nelle derivazioni bipolari la differenza di potenziale è calcolata tra coppie di elettrodi, posti lungo catene (longitudinali o trasversali) in cui un elettrodo è in comune tra due canali successivi (Fig. 12).

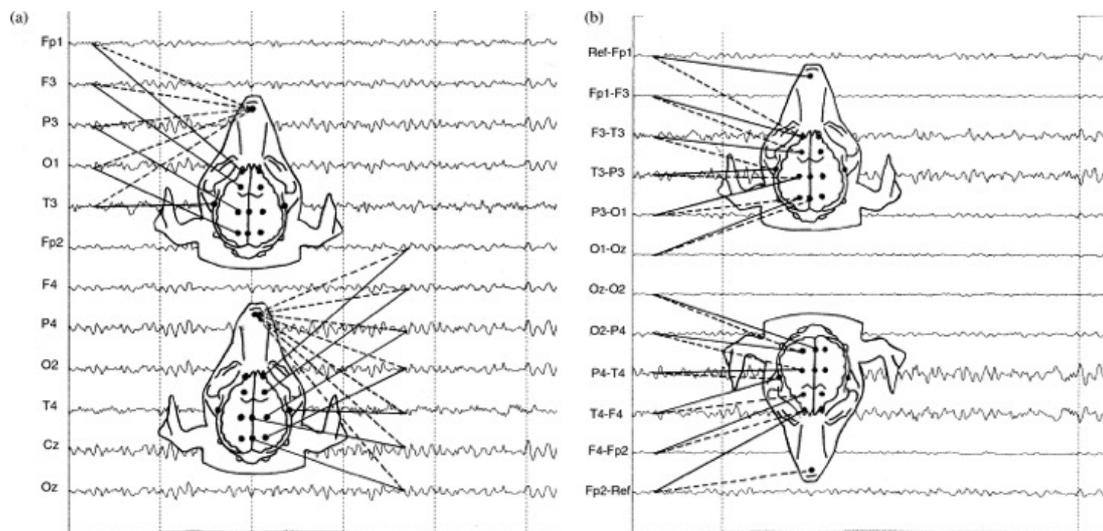


Figura 12. a) EEG di cane registrato con derivazione monopolare b) EEG di cane registrato con derivazione bipolare.

In questo modo un evento localizzato sotto un determinato elettrodo produrrà una deflessione uguale ma di segno opposto nei due elettrodi adiacenti che lo precedono e lo seguono nella catena elettroica (Holiday and Williams, 1999; Noachtar et al., 1999).

Infine, per montaggio si intende la specifica modalità di connessione degli elettrodi al canale registrante dell'elettroencefalografo.

In medicina veterinaria e nei laboratori EEG, anche se al giorno d'oggi non sono numerosissimi, esiste una grande varietà di montaggi impiegati nella pratica clinica, e molti di questi sono inadeguati e troppo complessi per le registrazioni di routine. Questa difformità impedisce il corretto scambio di informazioni tra gli specialisti del settore e va spesso a discapito dell'animale. In medicina umana per ovviare a ciò da molti anni sia la International Federation of Clinical Neurophysiology sia l'American Clinical Neurophysiology Society hanno pubblicato linee guida per standardizzare i montaggi ed il posizionamento degli elettrodi (Jasper, 1957).

## 2.7 Semeiologia EEG di base

Per poter descrivere e interpretare correttamente un grafoelemento EEG isolato o una serie di grafoelementi che si ripetono in successione nel tempo occorre tener conto della loro morfologia, ampiezza, frequenza, localizzazione e modalità di comparsa. Questi aggettivi ci permettono di classificare tutti i grafoelementi che possiamo riscontrare nella lettura di un tracciato elettroencefalografico. A seconda di come il grafoelemento appare (morfologia) esso potrà essere definito come lento (slow) oppure aguzzo o puntuto (wave o spike) (Fig. 13) (Tatum, 2008a).

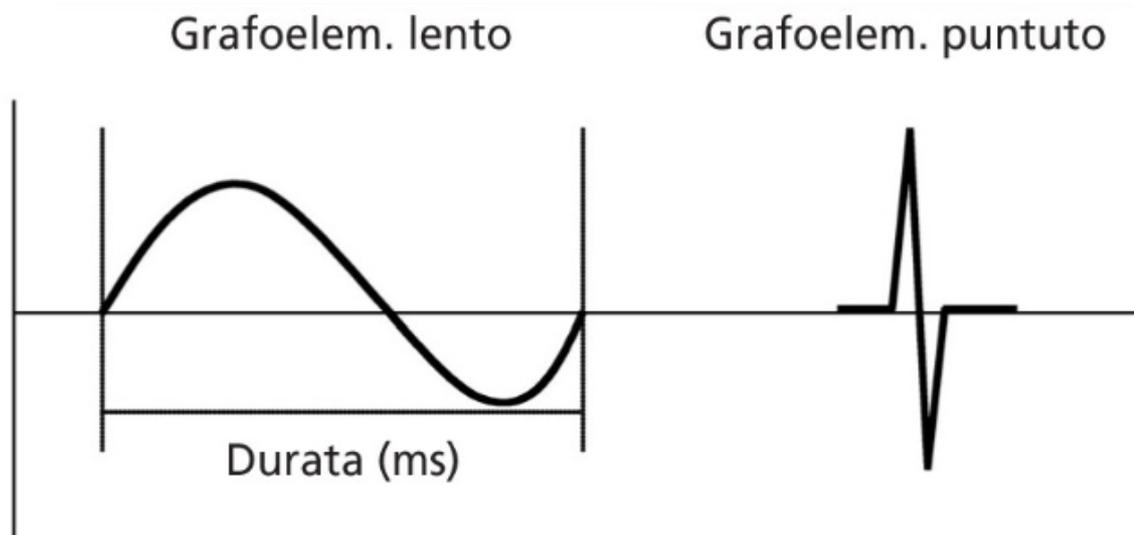


Figura 13. Caratteristiche morfologiche degli elementi EEG. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

I segnali lenti saranno quindi rappresentati da forme d'onda arrotondate, che durano molto nell'unità di tempo; se la loro forma è particolarmente regolare e si ripete con le stesse caratteristiche potranno essere anche definiti come segnali monomorfi, mentre se, pur nel rispetto della forma lenta, si osservano irregolarità, si potrà parlare di segnali lenti polimorfi. Gli spike invece durano meno nell'unità di tempo. La forma

di un segnale quindi è direttamente correlata con la durata del segnale stesso, che si misura in millisecondi (ms), intendendo per durata l'intervallo di tempo che intercorre tra l'inizio e la fine di un'onda singola o di un complesso (Mecarelli, 2009). La durata di uno spike è compresa fra 20 e 70 ms. La morfologia di un grafoelemento è poi descritta dalla fase, che si definisce dal punto in cui il segnale abbandona la linea isoelettrica al punto in cui ritorna alla stessa; a seconda di quante fasi ha un segnale esso si distinguerà in monofasico, bifasico, trifasico, polifasico (Fig. 14).

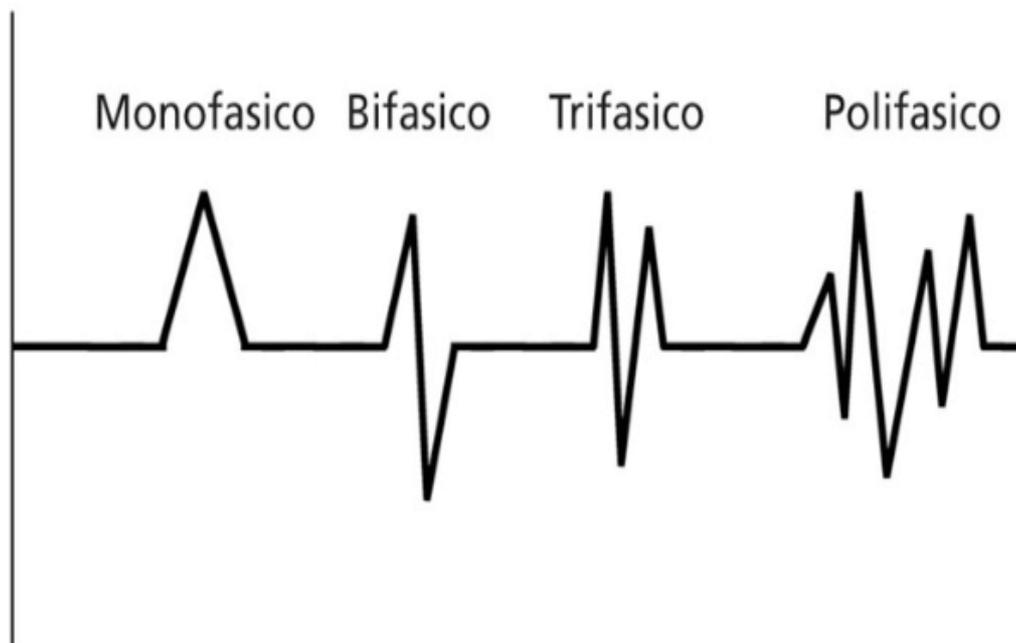


Figura 14. Caratteristiche morfologiche dei grafoelementi EEG. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Se un segnale compare su diversi canali di derivazioni bipolari con elettrodi in comune si potrà verificare il fenomeno dell'opposizione di fase o phase-reversal (l'onda del canale superiore avrà una fase diversa dal canale sottostante con i due apici che tenderanno a combaciare) o all'opposto quello dell'eversione di fase (Fig 15) (Mecarelli, 2009). La polarità è riferita al verso che ha un grafoelemento rispetto alla

linea isoelettrica. Per convenzione vengono definite positive le onde che si portano verso l'alto e negative quelle che si rivolgono verso il basso.

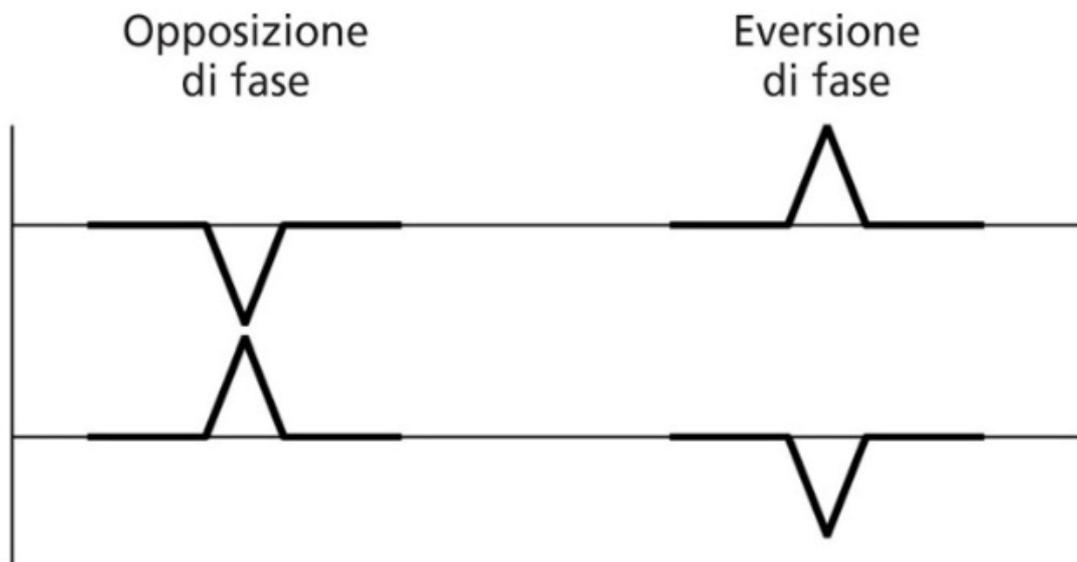


Figura 15. Esempio schematico di opposizione ed eversione di fase. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Un'altra caratteristica da considerare durante la lettura e l'interpretazione di un tracciato EEG è la sincronia degli eventi fra i due emisferi. La ripetizione dei segnali su aree diverse dell'emisfero omo- o controlaterale può avvenire rispettando la stessa fase, in modo simultaneo, e allora si parlerà di segnale sincrono, oppure con sfasamento e in questo caso il segnale sarà asincrono (Holliday, 2006).

Anche l'ampiezza di un segnale ( $\mu\text{V}$ ) è importante per caratterizzarlo dal punto di vista morfologico. L'ampiezza di un'onda si misura valutando l'altezza (in mm) dell'onda picco-picco e moltiplicandola per la sensibilità dell'amplificatore; in questo modo si otterrà il valore di voltaggio del segnale ( $\mu\text{V}/\text{mm}$ ). Quando si misurano segnali ottenuti in due o più canali di un emisfero ponendoli a confronto con quelli registrati dalle stesse regioni dell'emisfero controlaterale bisognerà anche descrivere la simmetria/asimmetria dei segnali, cioè se sono della stessa ampiezza o di ampiezza diversa.

Nel caso in cui segnali regolari si ripetano nell'unità di tempo il parametro fondamentale da valutare è la frequenza, espressa in Hertz (Hz). La frequenza di un segnale indica il numero di cicli completi di onde ripetitive o di complessi che si verificano in un secondo (Holliday, 2006). Nella figura 16 sono schematizzate le caratteristiche di ampiezza e frequenza di diversi segnali EEG che si ripetono sotto forma di ritmo.

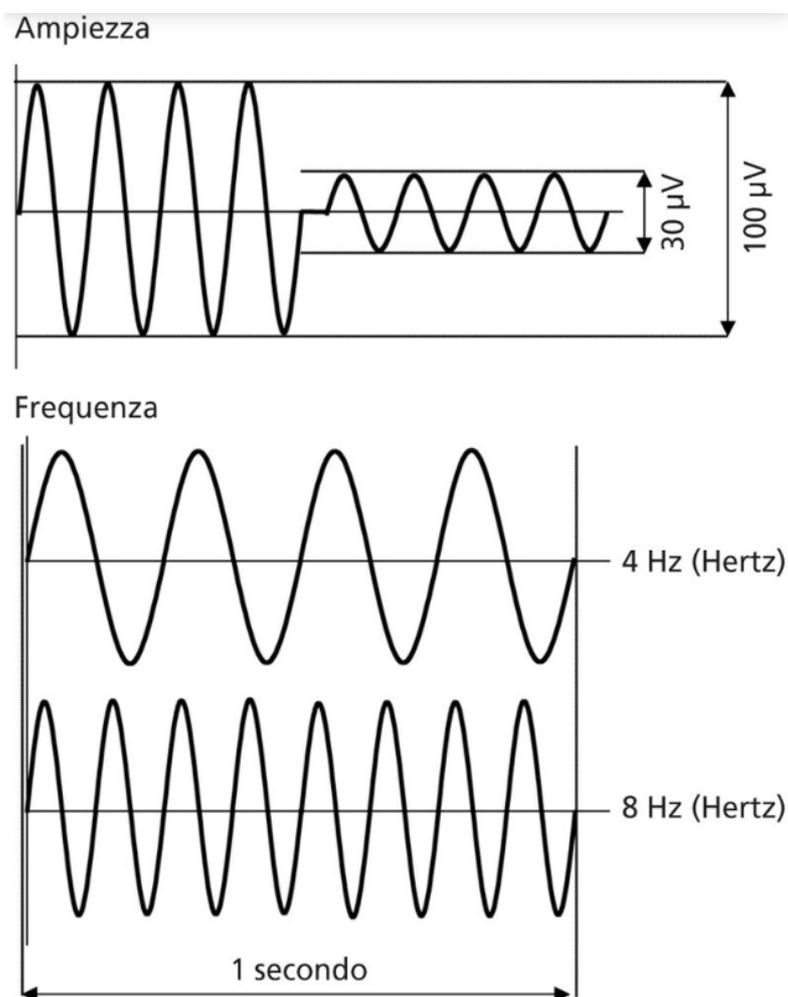


Figura 16. Ampiezza e frequenza di diversi segnali EEG ritmici. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Un parametro fondamentale per caratterizzare un evento EEG è la sua rappresentazione spaziale. Conoscendo la posizione degli elettrodi e le derivazioni utilizzate per la registrazione potremo ben definire tale localizzazione. Un determinato evento verrà definito focale quando presente su una singola area di un solo emisfero cerebrale oppure multifocale, se presente su aree diverse di un emisfero o di entrambi gli emisferi ma in modo asincrono. Un evento viene definito diffuso o generalizzato quando presente in modo sincrono su tutte le aree cerebrali di entrambi gli emisferi (Fig. 17) (Mecarelli, 2009).

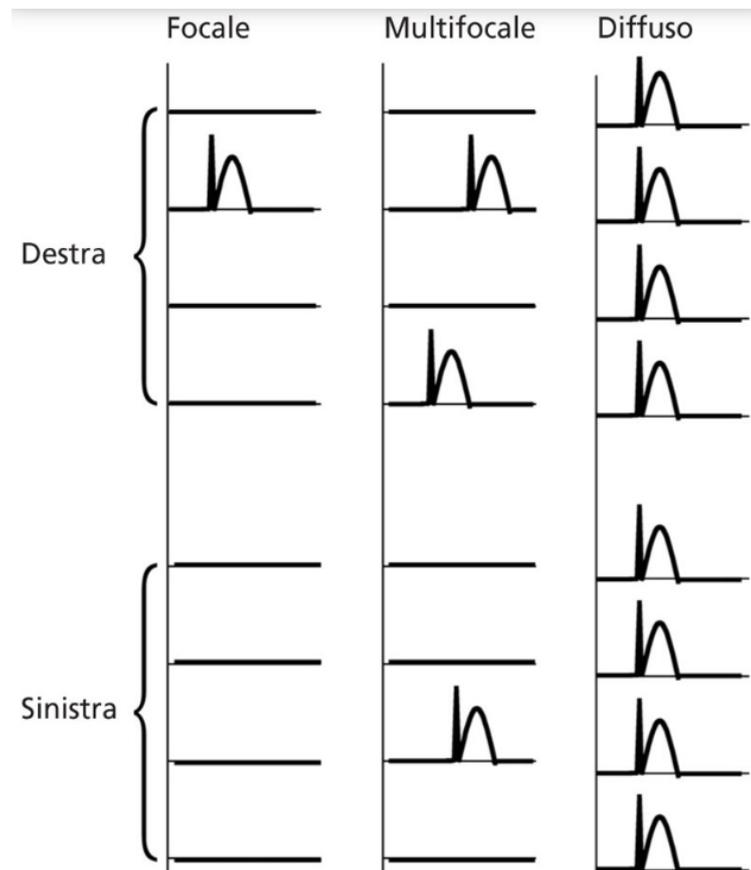


Figura 17. Rappresentazione schematica di fenomeni EEG focali, multifocali e diffusi. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Infine si deve considerare la ritmicità del tracciato EEG. Se un segnale sinusoidale si presenta costante ad una frequenza fissa, viene definito perfettamente ritmico, così come un complesso di onde (anche se morfologicamente irregolari) si presentano con una ciclicità regolare, vengono definite ritmiche. I pattern che presentano brevi intervalli di ripetizione ritmiche fra loro irregolari vengono definiti semiritmici (Fisch, 1999).

## 2.8 Artefatti

Gli artefatti sono una parte molto importante della semeiologia EEG. Per artefatto si intende qualsiasi elemento di origine extra cerebrale che si può registrare sui canali EEG e che in qualche modo disturba l'acquisizione e la visualizzazione del tracciato. Gli artefatti riconoscono molteplici origini e possono fondamentalmente dipendere da cause interne o esterne all'animale.

Gli artefatti oculari per esempio hanno una morfologia e una localizzazione tipica e forniscono informazioni immediate circa il corretto posizionamento degli elettrodi, i parametri di amplificazione, la profondità anestesiológica del paziente ecc. A volte un artefatto da elettrocardiogramma è in grado di evidenziare aritmie cardiache. Nei pazienti con epilessia la comparsa sul tracciato di artefatti muscolari, oculari, da movimento, può essere indicativa dell'insorgenza di una crisi. Nell'uomo le registrazioni durante il sonno necessitano di canali poligrafici che registrino artefatti oculari, da ECG, muscolari, legati alla respirazione, fondamentali per la stadiazione del sonno stesso. Infine, nei pazienti in coma si utilizzano stimolazioni di vario tipo e in base alla comparsa o meno di artefatti si possono avere informazioni importanti riguardo la gravità del disturbo di coscienza (Nunez, 2010).

Quindi, durante una registrazione EEG standard gli artefatti vanno riconosciuti, descritti e possibilmente eliminati. In condizioni particolari essi vanno invece

opportunamente valorizzati e anche registrati, proprio per ottenere da essi informazioni aggiuntive.

In modo molto schematico gli artefatti possono essere raggruppati in: artefatti di origine biologica o artefatti fisiologici, artefatti dovuti al sistema di acquisizione o strumentali; artefatti da interferenze elettriche e da apparecchiature esterne (Holliday, 1999, Klem, 2003).

Gli artefatti fisiologici includono: artefatto da movimento oculare, artefatti muscolari, artefatti da attività cardiaca e artefatti da movimento (Klem, 2003, Cauduro, 2017).

I movimenti oculari possono essere distinti in: movimenti saccadici, volontari o riflessi e consistono in movimenti rapidi degli occhi che l'uomo e gli animali fanno per spostare lo sguardo da un oggetto a un altro il più velocemente possibile; movimenti lenti di inseguimento; movimenti a tipo nistagmo, movimenti ritmici involontari degli occhi. Il nistagmo può essere a scosse, in cui si riconosce una componente lenta e una rapida o pendolare, con oscillazioni più o meno uguali in frequenza nelle due direzioni. I movimenti oculari in generale possono essere, secondo la direzione nello spazio, orizzontali, verticali, obliqui e rotatori. Inoltre possono essere coniugati o non coniugati. Un altro tipo di artefatto fisiologico legato al movimento oculare è il fenomeno dell'ammiccamento o blinking. Per ammiccamento si intende l'abbassamento della palpebra sul bulbo oculare (si parla di flutter per indicare blinking ripetuti, di ampiezza minore e frequenza maggiore). Gli artefatti che genericamente definiamo da movimento oculare consistono in deflessioni più o meno ampie e rapide, prevalenti sulle derivazioni frontali e temporali anteriori, dovute al movimento dei globi oculari o delle palpebre. Se dovuti al movimento delle palpebre si avranno delle deflessioni rapide (blink) ad alta frequenza, se invece sono dovuti ai movimenti dei globi oculari, a occhi chiusi, si avranno deflessioni più lente e a volte ritmiche (Fig. 18).

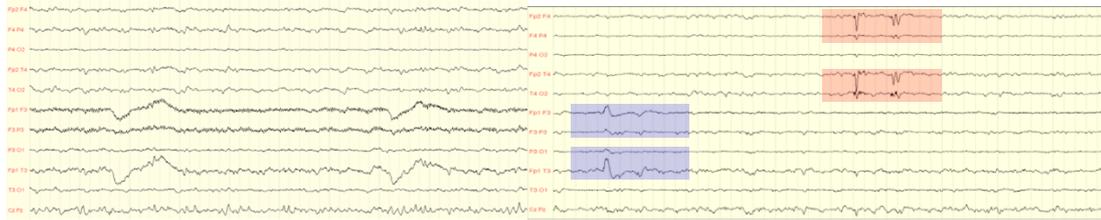
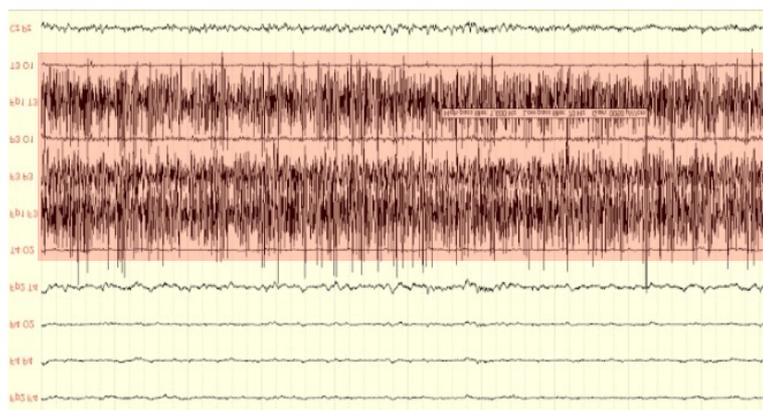


Figura 18. Tracciato EEG di routine in cui sono riconoscibili artefatti biologici oculari. Sul tracciato di sinistra sono riconoscibili artefatto da rotazione del bulbo oculare, in particolare la rotazione del bulbo oculare di destra. Nel tracciato a destra sono messi in evidenza degli artefatti da blinking.

L'artefatto di origine muscolare è ad alta frequenza, si sovrappone alle tracce EEG, coprendo tutta l'attività corticale sottostante. Questo tipo di artefatto è molto frequente, soprattutto in sede fronto-temporale (contrazione dei muscoli temporali), in sede frontale (contrazione dei muscoli facciali) e in sede temporo-occipitale (contrazione dei muscoli nuca). Per evitarlo è spesso necessario l'uso di farmaci anestetici/miorilassanti intradermici inoculati molto vicino all'elettrodo o gli elettrodi che registrano l'artefatto (Fig. 19).



captato per conduzione volumetrica dagli elettrodi cerebrali. Questo tipo di artefatto è più frequente evidenziarlo nei cani di grossa taglia, fatto probabilmente legato alla massa cardiaca maggiore. L'artefatto da ECG si presenta sotto forma di spikes di bassa-media ampiezza, sincrone con il complesso QRS. Per questi motivi, se possibile, è preferibile, anche nelle registrazioni di routine, monitorare l'attività cardiaca (Fig. 20a e 20b).

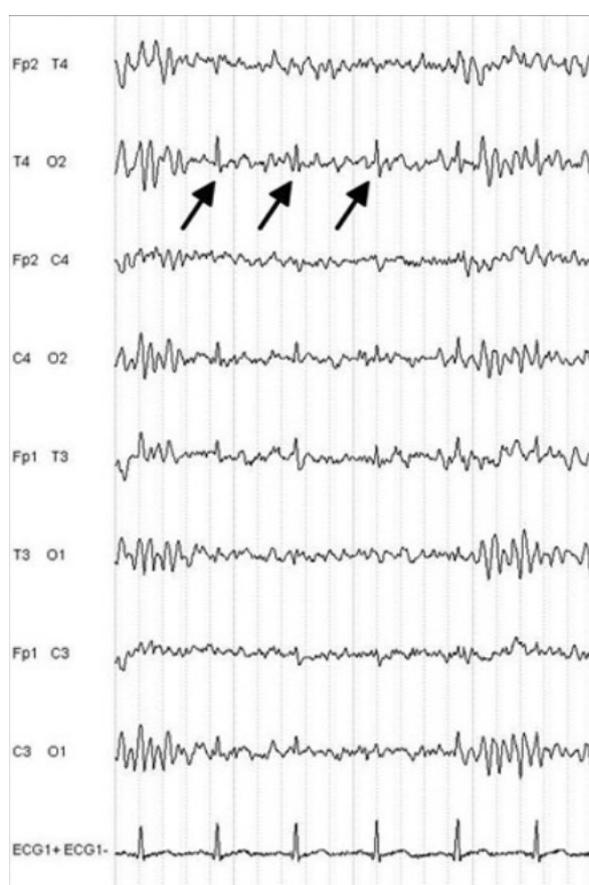


Figura 20a. Le frecce indicano degli spikes da ECG, perfettamente in sincronia coi i complessi QRS registrati in basso. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.



Figura 20b. Esempio tracciato EEG di un cane con persistente artefatto ECG in regione temporale sinistra.

Gli artefatti da movimento includono la respirazione, il tremore e tutti gli altri tipi di movimento involontario che possono instaurarsi nell'animale. Questo genere di artefatti possono verificarsi nel caso in cui l'animale faccia una crisi epilettica durante la registrazione EEG o per una diminuzione della profondità del piano anestesiológico.

L'altro grande gruppo di artefatti sono quelli non fisiologici. Sono dovuti ad interferenze elettriche esterne o interne alla strumentazione utilizzata. Gli artefatti non fisiologici strumentali sono dovuti a problemi correlati agli elettrodi, come l'artefatto da "ponte" interelettrodico o l'artefatto da cattivo contatto elettrodo-morsetto e connettore elettrodo-testina. Il primo manifesta con un appiattimento del tracciato nelle derivazioni bipolari, in cui alcuni canali hanno uno o più elettrodi in comune. Il grande aumento della conduzione nella porzione cutanea compresa tra 2 elettrodi riferiti tra loro, dovuto alla presenza di materiale conduttore in eccesso (soluzione liquida sottocutanea) riduce a zero, o a valori molto prossimi allo zero, la differenza di potenziale elettrico tra gli elettrodi stessi; gli artefatti da cattivo contatto elettrodo-morsetto sono caratterizzati da elementi puntuti o lenti, isolati o

in sequenze ritmiche, di ampio voltaggio. Talvolta questi artefatti possono simulare spikes epilettici rapidi e di bassa ampiezza (Fig. 21)

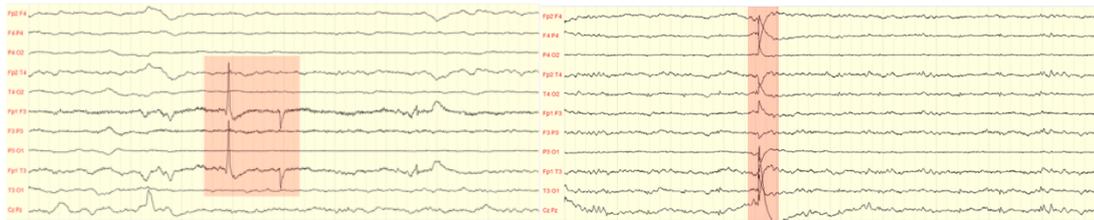


Figura 21. Esempi artefatti legati al malfunzionamento degli elettrodi.

Gli artefatti da interferenze elettriche da apparecchiature esterne sono molto frequenti. Rientrano in questa categoria gli artefatti da corrente alternata, artefatto da telefono e gli artefatti da interruttori (Young and Campbell, 1999; Klem, 2003).

Gli artefatti da corrente alternata sono rappresentati da un'attività rapida continua (a 50 Hz in Europa o a 60 Hz nei Paesi anglosassoni e in alcuni Paesi orientali), di ampiezza variabile. Si tratta di un segnale elettromagnetico generato da cavi elettrici o apparecchiature collegate alla rete elettrica (anche non in funzione), che si sovrappone al segnale cerebrale registrato rendendolo illeggibile (Fig. 22).

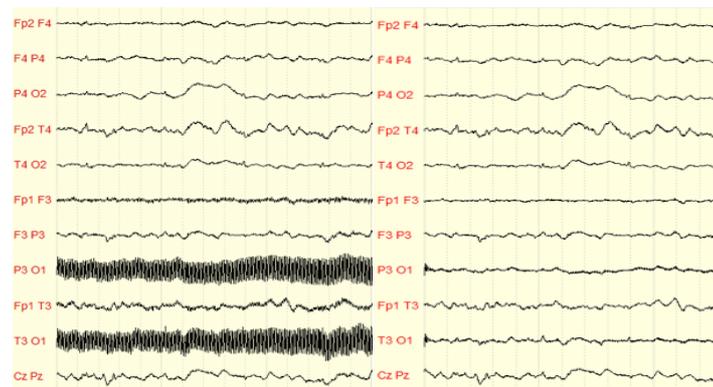


Figura 22. Esempi di due tracciati EEG. Sul tracciato di sinistra è ben evidente l'artefatto da corrente alternata in regione posteriore destra. Il tracciato di destra rappresenta la stessa situazione temporale di tracciato dopo l'inserimento del filtro a 50 Hz e questo permette la valutazione corretta dell'EEG.

Gli artefatti da telefoni cellulari si manifestano sotto forma di scariche diffuse puntute, a volte con l'aspetto di complessi punta e polipunta-onda. Tale artefatto è sempre di tipo elettromagnetico e compare di solito prima che il cellulare squilli, cioè quando l'apparecchio si prepara a ricevere o inviare una chiamata. Per evitarlo è ovviamente raccomandabile lo spegnimento di ogni dispositivo telefonico mobile durante la registrazione (Fig. 23).

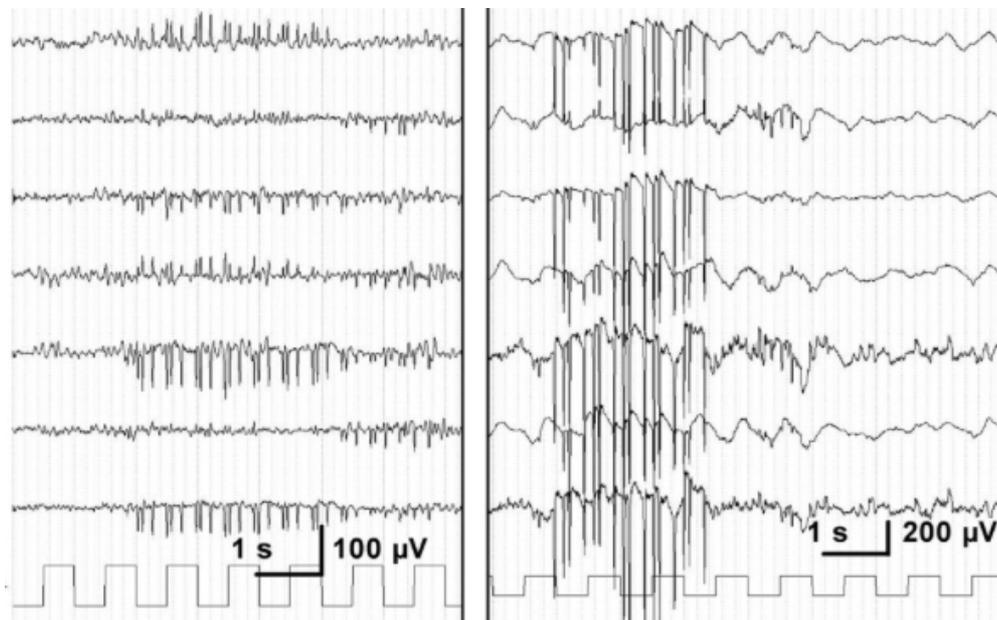


Figura 23. Due esempi di artefatto provocato da modelli diversi di telefono cellulare. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

Infine l'accensione e/o lo spegnimento (on-off) di apparecchiature alimentate elettricamente (lampade normali o al neon, strumenti elettromedicali, pompe da infusione ecc.) determina la comparsa sull'EEG di spikes rapide o di grafoelementi puntuti e lenti di ampio voltaggio, su uno o più canali EEG. Questo rappresenta l'artefatto da interruttore. Per evitare questi artefatti è necessario innanzitutto che gli impianti elettrici degli ambienti in cui si registra siano a norma. Occorre poi

individuare la fonte dell'artefatto e in casi particolari disattivare gli strumenti responsabili (Fig. 24) (Klem 2003, Cauduro, 2017).

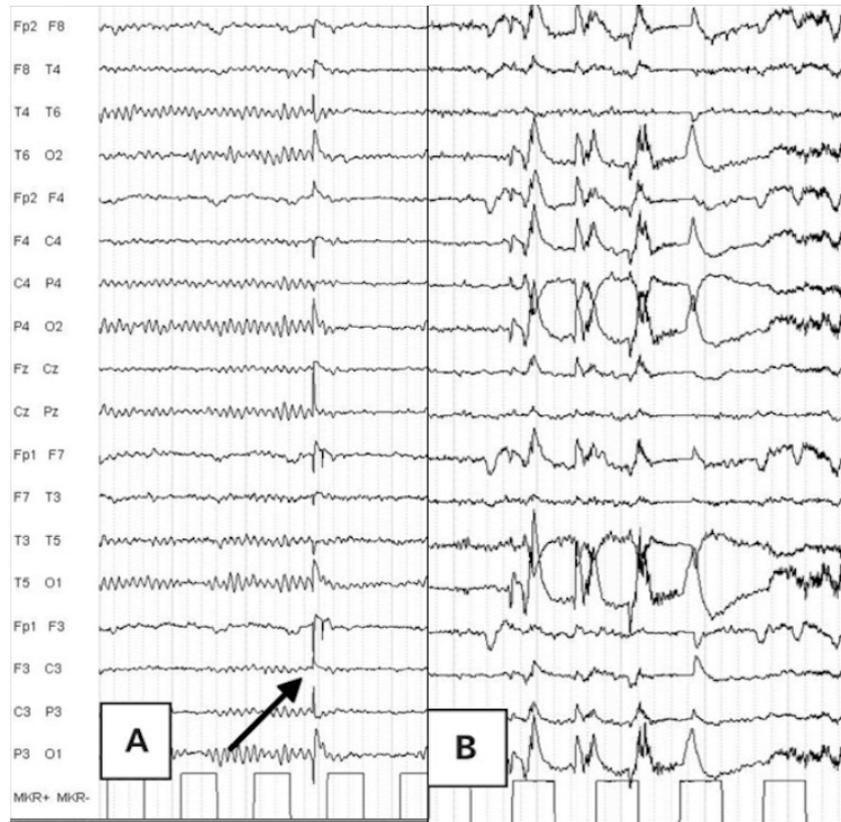


Figura 24. A) Accensione di luce normale B) Artefatti da lampade al neon. Foto tratta e modificata da Mecarelli, 2009.

## 2.9 Classificazione elettro-clinica delle crisi epilettiche

I quadri elettroencefalografici che possiamo riscontrare nella pratica clinica sono molto variegati ed ognuno ci può indirizzare verso un determinato quadro diagnostico (Fig. 25).

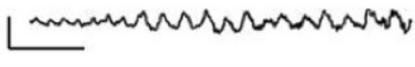
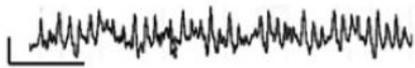
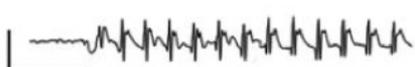
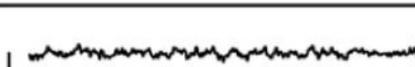
Rhythmical evolving theta, delta, alpha frequencies	
Rhythmical spiking	
Spike-Waves	
Electrodecremental (low voltage fast)	
Clinical seizure, but no clear EEG change	

Figura 25. Grafoelementi riscontrabili in un tracciato EEG patologico.

Fondamentalmente i possibili pattern patologici EEG che più frequentemente si riscontrano in pazienti affetti da epilessia possono essere la presenza di fenomeni parossistici, alterazioni dell'attività di fondo e pattern misti, in cui il parossismo si sovrappone ad un'alterazione dell'attività di fondo (Tatum, 2008b; Kaplan, 2008).

Da un punto di vista elettro-clinico le crisi epilettiche vengono classificate in focali e generalizzate, a seconda se il fenomeno parossistico è limitato ad un emisfero o coinvolge per intero la corteccia. Non è infrequente che fenomeni localizzati possono diffondere in quadri parossistici generalizzati (Fig. 26).

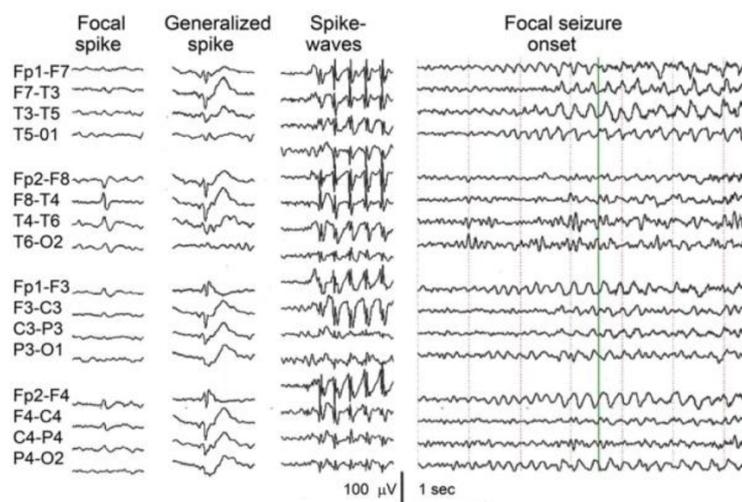


Figura 26. Esempi di tracciati EEG con attività parossistica focalizzata e generalizzata.

Vengono indicate come scariche epilettiformi inter-ittali quei fenomeni distinti di gruppi d'onde tipicamente espresse nei pazienti affetti da epilessia. Per evitare fraintendimenti terminologici, segue una breve definizione dei principali termini usati nell'attività clinica di routine dell'EEG.

Per parossismo si intende un evento encefalografico, anche singolo, che inizia e finisce bruscamente, che si distingue nettamente dall'attività di fondo. Per pattern critico o scarica (seizure pattern or discharge) si intende un fenomeno della durata di qualche secondo o più, consistente in grafoelementi epilettiformi ripetuti, con un inizio e una fine abbastanza ben riconoscibili; la scarica può essere focale o diffusa, associata o no a una componente clinica.

I grafoelementi epilettiformi che costituiscono i parossismi e le scariche sono: la punta (spike), complesso di punte o treni di punte (polyspike complex), l'onda puntuta (sharp wave), il complesso punta-onda lenta (spike- and slow-wave complex), complesso polipunta-onda lenta (polyspikes- and slow-wave complex) e il complesso onda puntuta-onda lenta (sharp- and slow-wave complex) (Kaplan, 2008; Niedermeyer, 2005c).

Lo spike è un evento transiente, chiaramente distinto dall'attività di fondo, ad apice puntuto, con componente principale in genere negativa, mono-bitrifasica, di ampiezza molto variabile e di brevissima durata. Il complesso di polipunte invece consiste in una sequenza di due o più spike consecutivi. Per onda puntuta, aguzza o angolare, si intende un elemento transiente chiaramente distinto dall'attività di fondo, con apice puntuto, bi-trifasico, di ampiezza variabile, di durata compresa tra 70-200 ms. L'attività lenta (delta o theta) è quella che maggiormente interferisce nell'alterazione dell'attività di fondo. La presenza di tale attività può essere considerata fisiologica in alcuni stadi del sonno. In pazienti in stato di veglia questo tipo di pattern EEG ci indirizza verso quadri patologici di origine sottocorticale, in particolare con coinvolgimento delle vie talamo-corticali.

Nelle epilessie generalizzate il tracciato EEG inter-ittale può essere caratterizzato da scariche parossistiche generalizzate, bilateri e sincrone. Nelle forme idiopatiche generalizzate il tracciato di solito non mostra un'alterazione dell'attività di fondo. Invece nelle forme sintomatiche il quadro elettroencefalografico può presentare attività di fondo anomala associata a presenza di attività parossistiche epilettiforme multifocale o asincrono bilaterale, oppure ci può essere esclusivamente un'alterazione dell'attività di fondo senza la presenza di attività parossistica.

Le epilessie focali sono caratterizzate dalla presenza di singoli picchi, spikes e complessi punta-onda. Questa attività parossistica può essere sincrona (all'interno dello stesso emisfero) o asincrona, intermittente o continua. L'attività di fondo può essere anomala presentando attività delta polimorfica, attività delta ritmica intermittente o attività theta (Berendt, 1999). La presenza di attività di scariche epilettiformi generalizzate in pazienti con epilessia focale può essere una conseguenza del fenomeno della sincronizzazione bilaterale secondaria e può portare ad un'errata diagnosi di epilessia generalizzata (Fig. 27).

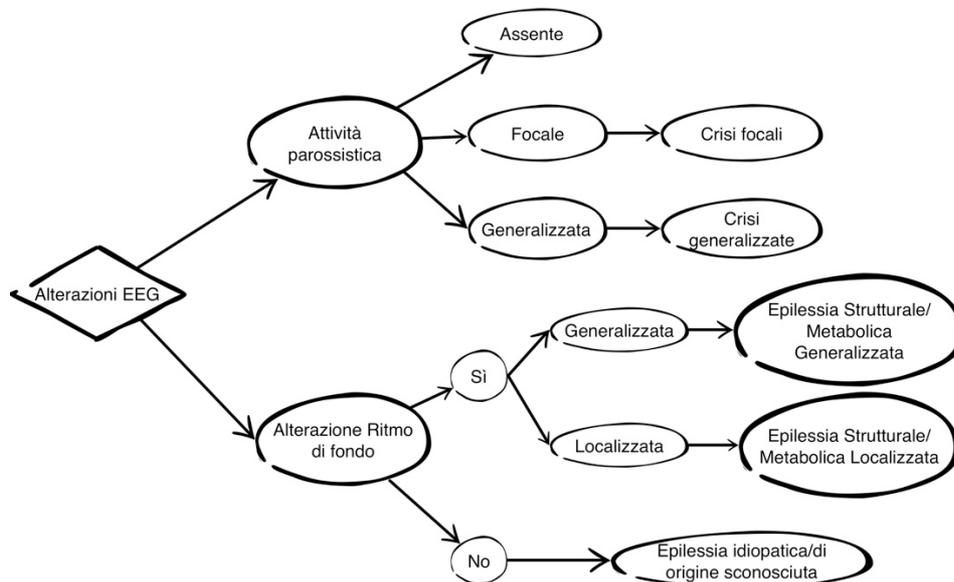
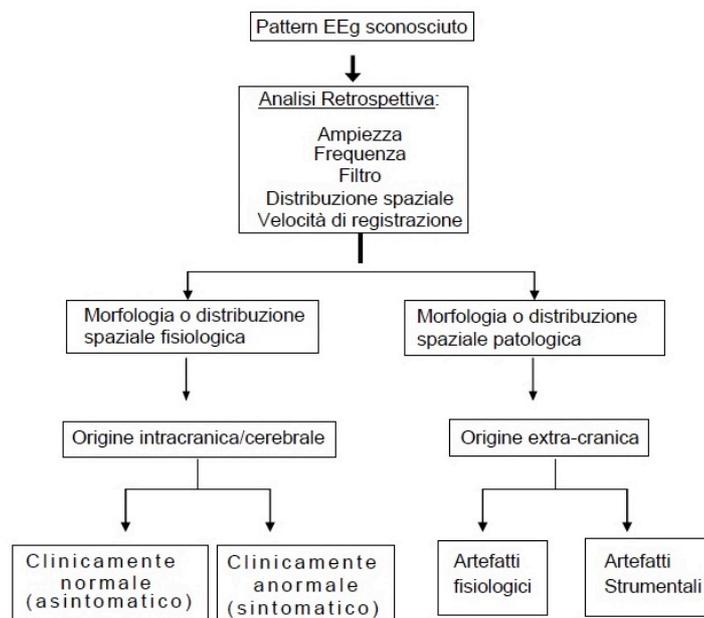


Figura 27. Schema per l'interpretazione elettro-clinica di un tracciato EEG.

Il processo analitico di base che si può adottare quando si incontrano pattern EEG sconosciuti è mostrato nello schema ad albero che segue:



Procedimento analitico di tracciato EEG, modificato da Fisch, 1999.

### 3. RISONANZA MAGNETICA

#### 3.1 Introduzione e principi

Con il termine “risonanza” si intende un fenomeno fisico secondo il quale due sistemi, uno accettore e uno erogante, si scambiano energia in modo proporzionale alla loro affinità intrinseca (Fig. 28).

Nello specifico della risonanza magnetica, il sistema accettore è rappresentato dai nuclei di idrogeno ordinati all'interno di un campo magnetico statico (CMS) di elevata intensità; il sistema erogante invece è rappresentato dalle onde elettromagnetiche nello spettro delle onde radio (RF). Le onde RF vanno a interferire con lo stato di equilibrio dei nuclei di idrogeno (H) fornendo energia che viene da essi accettata solo se la frequenza delle RF si accorda con la loro frequenza intrinseca.

Quando le RF non vengono più erogate il sistema ricevente, ovvero i nuclei di H, cede l'energia in eccesso sotto forma di radiofrequenza con modalità differente in base al tessuto e quindi al legame specifico dei nuclei idrogeno con le altre molecole (acqua, proteine, zuccheri...) fino al momento in cui ritorna allo stato di equilibrio iniziale (Pozzi,2004).

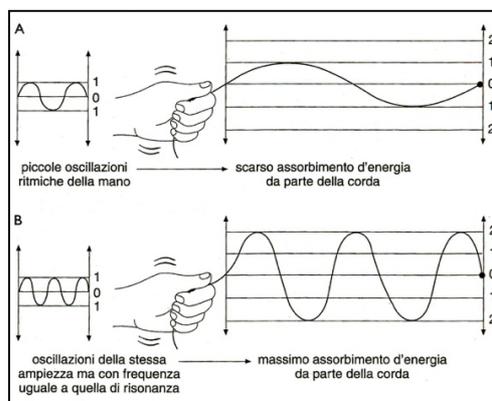


Figura 28. Fenomeno di risonanza

### 3.2 Sequenze

Le sequenze si basano sull'invio di impulsi di radiofrequenza (RF) e sulla variazione dei gradienti magnetici locali  $G_x$  (gradiente di lettura, raccoglie dati su uno dei due assi del piano dello strato analizzato),  $G_y$  (gradiente di codifica di fase, fornisce informazioni spaziali sull'altro asse del piano),  $G_z$  (gradiente di selezione dello strato, determina lo strato da esaminare) applicati in presenza del campo magnetico statico. Infatti, variando gli impulsi RF è possibile interferire con il contrasto dell'immagine, mentre, modificando i gradienti, l'operatore ha la possibilità di controllare la localizzazione spaziale delle immagini. Le sequenze vengono classificate in: sequenze convenzionali, Spin Echo (SE) e Inversion Recovery (IR) + (STIR, SPIR, FLAIR); sequenze rapide, Gradient Echo (GE), Fast o Turbo Spin Echo (FSE o TSE) e Gradient Echo Spin Echo (GRASE); e le sequenze ultrarapide, Echo Planar Imaging (EPI) e Half Fourier Single Shot Spin Echo (HASTE) (Passariello 1990, Pozzi 2004).

### 3.3 Sequenze ultrarapide

La sequenza Spin Echo (SE) rappresenta la prima sequenza utilizzata in risonanza magnetica. È caratterizzata da un'elevata capacità di determinare un contrasto tra i diversi tessuti e risulta relativamente poco sensibile alle disomogeneità del campo magnetico. La sequenza SE consiste nell'invio di un primo impulso selettivo a  $90^\circ$ , seguito da un impulso a  $180^\circ$ . In seguito all'impulso a  $90^\circ$  gli spin si spostano dall'asse  $z$  (longitudinale) all'asse  $xy$  (assiale) e questo determina l'inizio del defasamento. Il successivo impulso a  $180^\circ$  corregge il defasamento e inoltre annulla le eventuali disomogeneità del campo magnetico (Gavin, 2011).

Per ricostruire l'immagine RM è necessario inviare tante successive sequenze di

impulsi a 90° e a 180° quante sono le linee della matrice (ad esempio per una matrice a 512x512 la sequenza dovrà essere ripetuta 512 volte).

Nelle sequenze SE le variabili che maggiormente sono in grado di influenzare l'acquisizione dell'immagine, e di conseguenza la semeiotica del segnale, sono il tempo di ripetizione (TR) ovvero il tempo che intercorre tra l'inizio di una sequenza e l'inizio di quella successiva e il tempo di eco (TE), cioè l'intervallo di tempo tra l'impulso a 90° e la comparsa dell'eco.

Il TR influenza principalmente la T1-dipendenza, mentre il TE la T2-dipendenza della sequenza utilizzata.

Questa sequenza fornisce dati relativi ai principali parametri intrinseci tissutali quali T1, T2 e densità protonica (DP); variando il TR e il TE è possibile selezionare sequenze Spin Echo dipendenti dai tre parametri sopracitati: utilizzando TR e TE brevi si ottengono SE T1 dipendenti, con TR e TE lunghi si avranno sequenze SE T2 dipendenti mentre con TR lungo e TE breve si otterranno sequenze SE DP dipendenti.

*Nelle sequenze SE T1-dipendenti:* sono iperintensi i tessuti o i liquidi con un breve tempo di rilassamento T1 (ad esempio il grasso), mentre appaiono ipointensi quelli con tempo di rilassamento T1 lungo (ad esempio il liquor).

*Nelle sequenze SE T2-dipendenti:* sono iperintensi i tessuti o i liquidi con un tempo di rilassamento T2 lungo (liquor), mentre sono ipointensi quelli caratterizzati da un T2 breve (grasso, sostanza bianca) (Pozzi, 2004).

La sequenza SE T1-dipendente è in grado di caratterizzare in modo molto accurato la morfologia delle strutture esaminate; per questo motivo rappresenta sempre la prima fase per uno studio di risonanza magnetica.

La sequenza SE T2-dipendente è invece più sensibile alle modificazioni patologiche dei tessuti analizzati ed è indispensabile per lo studio delle patologie del SNC.

L'invio di un impulso a 90° seguito da un impulso a 180° è responsabile però di un tempo di acquisizione d'immagine molto lungo che rappresenta lo svantaggio

maggiore della sequenza Spin Echo (Pozzi, 2004).

La sequenza Inversion Recovery È caratterizzata da un impulso preparatorio di inversione a  $180^\circ$ , che precede gli impulsi di eccitazione di qualunque altra sequenza. L'impulso a  $180^\circ$  causa l'inversione della magnetizzazione longitudinale (ML) da up a down; quando l'impulso termina la ML ritorna all'equilibrio (up); mentre la ML ritorna all'equilibrio raggiunge un momento in cui la sua componente vettoriale è nulla in entrambe le direzioni, questo punto è definito come "null point" ed è specifico per ogni tessuto.

In questa sequenza i tempi di ripetizione (TR) devono necessariamente essere lunghi in quanto devono consentire ai tessuti analizzati di recuperare (recovery) la magnetizzazione in seguito agli impulsi preparatori.

I tessuti con breve T1 recuperano rapidamente la loro magnetizzazione (ad esempio il grasso) ed in seguito all'invio dell'impulso a  $90^\circ$  rispondono con un forte segnale. Invece i tessuti con un lungo tempo di rilassamento T1 (liquor), poiché non sono ancora riusciti a recuperare del tutto la propria magnetizzazione, risponderanno con un segnale molto più debole (Pozzi, 2004).

Da queste caratteristiche tissutali si può dedurre che in questa particolare sequenza assume una grande importanza un altro parametro, ovvero il tempo di inversione (TI) che rappresenta l'intervallo che intercorre tra l'impulso preparatorio e l'inizio della vera e propria sequenza. Le variazioni del TI apportate dall'operatore andranno a determinare una maggiore dipendenza (o pesatura) T1 dell'immagine.

Questa sequenza offre inoltre la possibilità di sopprimere il segnale proveniente da uno specifico tessuto in quanto è possibile, conoscendo il tempo di inversione del tessuto, selezionare il valore di "null point" di un certo tessuto e annullare così la relativa componente ML responsabile del segnale di risonanza magnetica.

Sulla base del segnale che si vuole annullare distinguiamo diversi tipi di sequenza IR: la STIR (Short Tau IR), la SPIR (Selective Partial IR) e la FLAIR (Fluid Attenuated IR).

**STIR:** viene impiegata nello studio di distretti a contenuto adiposo (orbita, rachide in quanto ricco di midollo giallo). Viene annullato il segnale proveniente dal grasso attraverso l'utilizzo di un TI molto breve (100-200 msec, pari a quello del tessuto adiposo).

Lo svantaggio della STIR risiede nel fatto che non vengono soppressi esclusivamente i segnali provenienti dal grasso ma anche quelli di altri tessuti o liquidi biologici che, come il tessuto adiposo, sono caratterizzati da un breve tempo di rilassamento T1 (ad esempio ematomi con metaemoglobina, cisti iperproteiche); inoltre, possono involontariamente essere annullate eventuali impregnazioni patologiche a seguito della somministrazione del mezzo di contrasto.

**SPIR:** a differenza della STIR è in grado di annullare esclusivamente il segnale proveniente dal tessuto adiposo utilizzando una specifica presaturazione spettrale.

**FLAIR:** utilizza tempi di inversione lunghi (1800-2500 msec che corrispondono ai tempi di TI del liquor) annullando il segnale proveniente dal liquor (ventricoli cerebrali, cisti aracnoidee, ecc...) e contemporaneamente consente alla maggior parte dei tessuti molli di recuperare la magnetizzazione longitudinale.

La FLAIR consente di ottenere una definizione migliore di eventuali lesioni localizzate vicino agli spazi liquorali che potrebbero essere sfuggite all'operatore a causa dell'elevato segnale del liquor in sequenze T2 pesate convenzionali. Permette inoltre di utilizzare TE lunghi, anche di 120-200 msec, ottenendo così un'immagine fortemente T2 pesata utile per evidenziare lesioni con bassa differenza di contrasto rispetto ai tessuti contigui (ad esempio lesioni encefaliche) (Gavin, 2011).

### 3.4 Sequenze rapide

La sequenza Gradient Echo (GE) è caratterizzata da una sensibile riduzione dei tempi di acquisizione rispetto alla Spin Echo; questo perchè i valori di TR e di TE sono molto ridotti (Passariello, 1990; Pozzi, 2004).

Questa sequenza sostituisce l'iniziale impulso a  $90^\circ$ , che caratterizza la SE, con un impulso con flip angle (FA) inferiore a  $90^\circ$ ; inoltre, subito dopo l'impulso RF, viene applicato un gradiente lungo l'asse di lettura (Gx) che determina un cambiamento lineare del campo magnetico causando così una differente frequenza di risonanza degli spin correlata alla loro posizione rispetto all'asse di lettura. Il defasamento creato viene poi successivamente corretto applicando un nuovo gradiente di uguale intensità ma di segno opposto che determina il rifasamento degli spin e genera l'eco. L'eco, quindi, che nella sequenza Spin Echo viene generata dalla successiva applicazione dell'impulso a  $180^\circ$ , nella sequenza GE è invece generata dall'applicazione di un gradiente ("eco di gradiente").

Con la GE è possibile variare TR, TE ma anche l'FA; quest'ultimo controlla il grado di contrasto dipendente dal tempo di rilassamento T1, in generale un'immagine fortemente T1-pesata si ottiene con un FA  $>60^\circ$  e con un TE breve ( $>10$  msec), mentre utilizzando un FA  $<20^\circ$  e un TE lungo si ottiene una maggiore dipendenza T2 o meglio T2\*. Il fatto di non utilizzare un impulso a  $180^\circ$  (che neutralizza la maggior parte delle disomogeneità del campo magnetico) ma un gradiente implica che i protoni vadano più rapidamente fuori fase in quanto vengono maggiormente influenzati dalle disomogeneità del campo magnetico. Questa caratteristica da un lato rappresenta uno svantaggio, in quanto l'immagine acquisita ha un numero maggiore di artefatti, dall'altro però consente di rilevare microquantità di sostanza paramagnetiche (ad esempio depositi tissutali di Calcio, Ferro, emosiderina) (Gavin, 2011).

La sequenza Fast o Turbo Spin Echo (FSE o TSE) può essere considerata come una Spin

Echo rapida multieco. Vengono introdotti due parametri tecnici: l'Echo Train Length (ETL), e l'Echo-spacing (ES).

**ETL:** è il parametro fondamentale. Si tratta di echi successivi uno all'altro generati nello stesso TR attraverso impulsi a  $180^\circ$  successivi al primo impulso a  $90^\circ$ . Questi echi sono codificati da un diverso gradiente di codifica di fase e determinano, inoltre, la contemporanea trascrizione di più linee del "k space".

Aumentando l'ETL si riduce il tempo per l'acquisizione dell'immagine (la velocità di ricostruzione del "k space" è direttamente proporzionale al numero di echi) ma aumentano gli artefatti e la T2-dipendenza della sequenza.

**ES:** rappresenta l'intervallo tra gli echi; ad un aumento dell'ES è correlata una riduzione del contrasto dell'immagine ed un incremento degli artefatti.

Le sequenze FSE T1-dipendenti sono poco utilizzate in quanto non comportano una significativa riduzione del tempo di acquisizione rispetto ad una sequenza SE convenzionale ed inoltre sono più sensibili agli artefatti.

Le sequenze FSE T2-dipendenti invece sono più sfruttate poichè permettono di ottenere l'acquisizione dell'immagine in un tempo inferiore rispetto ad un'equivalente SE.

Dato che le immagini ottenute sono il risultato dell'applicazione di multiechi e non di un gradiente, il contrasto generato è più simile alla sequenza SE rispetto che alla GE. La modalità di trascrizione dello spazio k è responsabile di alcune differenze semeiologiche riguardanti l'intensità del segnale del liquor e del grasso.

Nelle sequenze FSE T2-dipendenti con valori di TR superiori a 3000 msec il segnale del liquor risulta maggiormente iperintenso rispetto ad una sequenza SE T2-dipendente convenzionale e questo può determinare uno svantaggio nel caso in cui, ad esempio, ci sia la presenza di lesioni periventricolari in uno studio dell'encefalo. Per evitare questo inconveniente si può utilizzare una sequenza FSE con un TR inferiore ai 300 msec oppure si può ricorrere ad una FAST FLAIR in grado di annullare il segnale

proveniente dal liquor.

Nelle sequenze FSE il tessuto adiposo è maggiormente iperintenso nelle sequenze T1-dipendenti e anche nelle T2-dipendenti, a differenza della SE, mantiene ugualmente un forte intensità; questo particolare può determinare degli errori diagnostici in quanto potrebbe mascherare alcune patologie o potrebbe creare un eccesso di artefatti. Anche in questo caso è utile sfruttare una sequenza in grado di sopprimere il segnale proveniente dal grasso come la FSE-STIR.

La sequenza Gradient and Spin Echo (GRASE) è una tecnica ibrida, assimila i vantaggi della FSE e della GE. Si combina l'utilizzo di echi di gradiente per ciascun TR e di impulsi RF 180°, in numero ridotto rispetto alla FSE, consentendo così di ridurre i tempi di acquisizione rispetto ad una classica sequenza FSE. È possibile inoltre utilizzare una variante della GRASE a single-shot, con tempi di acquisizione ancora più rapidi, denominata RF-EPI (Pozzi, 2004).

### 3.5 Sequenze ultrarapide

Nel tempo di un singolo TR viene acquisito un solo impulso e vengono acquisite tutte le linee che costituiscono lo spazio k. L'immagine ottenuta è fortemente T2-dipendente. Rientrano nelle sequenze ultrarapide le sequenze dette a "single shot" quali le Echo Planar Imaging (EPI) e le Half-Fourier Single Shot Spin Echo (HASTE) (Pozzi, 2004).

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 Tipo di Studio

Studio di accuratezza diagnostica

### 4.2 Obiettivi dello studio

Valutazione di sensibilità, specificità e valori predittivi dell'elettroencefalografia (EEG) eseguita nella fase inter-ittale per la caratterizzazione elettro-clinica dell'epilessia canina idiopatica.

### 4.3 Disegno dello studio

Il disegno sperimentale dello studio è di tipo prospettico, in cui la raccolta dei dati clinici e di laboratorio è stata pianificata prima di eseguire il test in studio e quello di riferimento. Il test in studio (Index test, It) è l'elettroencefalografia (EEG), mentre quello di riferimento (Reference Standard test, RSt) è la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) a basso campo (0.2 Tesla) associata all'esame del Liquido Cefalo Rachidiano (LCR).

### 4.4 Criteri di inclusione ed esclusione

I criteri di inclusione nello studio sono sovrapponibili a quelli proposti nel primo livello di confidenza diagnostica (Tier I) per l'epilessia idiopatica definiti nelle linee guida "International Veterinary Task Force Consensus Proposal: diagnostic approach to epilepsy in dog" (De Risio, 2015) ad esclusione dei soggetti in fase post-ittale (nelle 48 ore successive alla crisi) e l'estensione dei limiti di età ai 14 anni. In particolare, ai fini del presente studio sono stati considerati arruolabili soggetti di tutte le razze appartenenti alla specie *canis lupus familiaris* di età compresa fra i 6 mesi e i 14 anni,

senza distinzione di sesso, aventi manifestato due o più crisi epilettiche parziali o generalizzate a distanza di più di 24 ore di tempo l'una dall'altra, oppure una condizione di stato epilettico sotto forma di crisi convulsiva continua o a grappolo. Sono stati inclusi nello studio sia soggetti in terapia con farmaci antiepilettici sia soggetti non in trattamento. Tutti i cani arruolati nello studio e sottoposti ai test non avevano manifestato alcun sintomo neurologico nel periodo inter-ittale e non avevano avuto alcuna crisi nelle 48 ore precedenti la visita di inclusione.

I criteri di esclusione sono stati l'età inferiore o maggiore rispetto all'intervallo 6 mesi – 14 anni; lo stato di gravidanza; la diagnosi pregressa di malattie cardiovascolari clinicamente rilevanti accertate (con visita cardiologica completa ed ecocardiografia doppler); forme accertate di epilessia reattiva legata a problemi dismetabolici extra cranici (ipoglicemia, iperammoniemia, iperazotemia, alterazioni elettrolitiche) e patologie endocrine.

#### 4.5 Animali

Sono stati inseriti nello studio 152 cani di varie razze, di cui 43 femmine e 109 maschi, selezionati con procedura di inclusione seriale fra quelli riferiti per consulto o approfondimento diagnostico presso la *Clinica Veterinaria Neurovet* di Legnano (MI) da ottobre 2013 a marzo 2015, per crisi epilettiche ricorrenti. Tutti i cani considerati erano di proprietà ed ogni proprietario ha fornito il proprio consenso all'esecuzione delle indagini cliniche dopo essere stato informato sul percorso diagnostico da effettuare e i relativi costi da sostenere.

Su ogni soggetto sono stati eseguiti l'esame obiettivo generale, la visita neurologica esami ematologici completi di conta cellulare e formula leucocitaria, esami emato-biochimici e delle urine, ed esame radiologico del torace e dell'addome. I parametri biochimici comprendevano: sodio, potassio, cloro, calcio, fosfato, alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP), bilirubina totale, urea, creatinina,

proteine totali, albumina, glucosio, colesterolo, trigliceridi, acidi biliari a digiuno, creatinina chinasi (CK) e lattato. L'esame delle urine comprendeva: peso specifico, proteine, glucosio, pH, analisi del sedimento e citologia. In alcuni casi per escludere il sospetto di alcune patologie correlate a forme di epilessia reattiva sono stati valutati i livelli sierici di: acidi biliari a digiuno e post-prandiali, ammoniemia a digiuno per l'encefalopatia epatica; T4 totale (TT4), T4 libero (fT4) e TSH in caso di patologia tiroidea; ed i livelli sierici di fruttosamine in caso di insulinoma.

#### 4.6 Metodi dei test

Sui soggetti reclutati per studio sono stati effettuati con la stessa sequenza i seguenti esami: elettroencefalografia (EEG), risonanza magnetica nucleare (RMN o MRI) del neurocranio ed esame del liquido cefalo rachidiano (LCR). Ogni tipo di test è stato eseguito da operatori distinti, ognuno dei quali non era a conoscenza dei risultati clinici degli altri esami. La refertazione di ogni tipo di test è stata fatta indipendentemente ed in modalità "blinded".

Per l'esame EEG è stato utilizzato il sistema integrato per elettromiografia, potenziali evocati ed elettroencefalografia a 32 canali Brainquick Micromed, con software System Plus Evolution dedicato all'acquisizione, all'elaborazione e alla refertazione dei tracciati. Per le registrazioni sono stati utilizzati aghi elettrodo subdermali monouso Spes Medica di tipo monopolare in titanio del diametro di 0,4 mm x 13 mm di lunghezza, con cavo lungo 100 cm.

La RMN è stata effettuata con attrezzatura Esaote Sistema Vet-MR GRANDE 0.2 Tesla utilizzando per gli studi le sequenze T1W, T2W, Flair e T1W post contrasto paramagnetico con spessore delle sezioni di 3 mm, come è anche indicato nelle linee guida "International Veterinary Epilepsy Task Force recommendations for a veterinary epilepsy-specific MRI protocol" (Rusbridge, 2015).

L'esame del Liquido Cefalo Rachidiano (LCR) è stato eseguito valutando inizialmente colore, aspetto e pressione liquorale di uscita. Successivamente è stata valutata la presenza di proteine (protidorrachia), di glucosio (glicorrachia) e l'esame citometrico con conta cellulare totale e differenziale. In casi di sospetta infezione è stata eseguita la colorazione di Gram e successiva coltura batterica.

L'esame elettroencefalografico (EEG) è stato eseguito con la tecnica descritta da Pellegrino e Sica (Pellegrino, 2004). In particolare il posizionamento degli elettrodi registranti è stato modificato variando bilateralmente la profondità dell'elettrodo temporale inserendolo nel sottocute e non in prossimità della scatola cranica, al fine di uniformare la conduttanza di tutti gli aghielettrodo.

Le registrazioni EEG sono state effettuate con i cani in anestesia generale per infusione continua di Propofol somministrato per via endovenosa (Total IntraVenous Anaesthesia, (TIVA) dopo essere stati sedati con dexmedetomidina alla posologia di 1 µg/kg per via intramuscolare. La profondità del piano anestesilogico è stata tale da mantenere l'assenza del riflesso di deglutizione associato alla presenza del riflesso palpebrale, inoltre è stata mantenuta l'intubazione oro-tracheale per permettere una somministrazione controllata di ossigeno. Al momento di effettuare la risonanza magnetica e l'esame del liquor l'anestesia per via endovenosa è stata sostituita da quella gassosa utilizzando Isoflurano.

L'effettiva acquisizione e registrazione delle tracce EEG è durata almeno 20 minuti per ogni cane e ogni tracciato è stato esaminato visivamente durante e dopo la procedura da un operatore qualificato. Da ogni tracciato EEG, mediante Visual Pattern Analysis, sono state successivamente selezionate ed estratte 120 epoche della durata di 5 secondi ognuna, tutte prive di artefatti di origine ambientale o muscolare, ad eccezione di quelli di origine cardiaca, per un totale di 10 minuti di tracciato privi di tutte le interferenze che ne avrebbero potuto alterare l'interpretazione.

Di ogni epoca sono state annotate l'eventuale presenza di attività parossistica inter-ittale, la presenza di frequenze lente focali e l'alterazione del ritmo di fondo. Come attività parossistica inter-ittale sono stati considerati nella stessa categoria tutti i grafoelementi aventi lo stesso significato fisiopatologico: punte singole, treni di punte, complessi punta-onda acuta, complessi onda acuta-onde lente e attività elettro-decrementale (low voltage fast activity). Per l'attività cerebrale di fondo e per l'attività lenta focale sono stati considerati sia il tipo di frequenza che il ritmo. Di ogni grafoelemento, parossistico o meno, sono stati registrati ampiezza del potenziale, localizzazione anatomica (rispetto agli elettrodi), sincronia e simmetria inter-emisferica ed intra-emisferica delle onde.

I suddetti grafoelementi sono stati classificati mediante ispezione visiva delle tracce usando sia un montaggio monopolare referenziale sia uno bipolare longitudinale, con amplificazione visiva dei potenziali variabile a seconda delle dimensioni del cranio. Per i soggetti di piccola taglia è stata impiegata un'amplificazione di 70  $\mu\text{V}/\text{cm}$ , per i soggetti di media taglia di 50  $\mu\text{V}/\text{cm}$  mentre per quelli di grossa taglia di 30  $\mu\text{V}/\text{cm}$ .

Il calcolo di controllo sulle frequenze di fondo dominanti e focali lente è stato eseguito in modo semiautomatico utilizzando il modulo software integrato Micromed System Plus Evolution per l'analisi di Fourier in tempo reale (FFT) sui tracciati EEG.

Ai fini statistico-descrittivi di ogni tipo di alterazione EEG è stata considerata solo la sua presenza o meno all'interno di una determinata epoca, e per ogni tracciato è stato indicato il numero di epoche appartenenti alle due categorie considerate: cioè quella delle alterazioni parossistiche e quella delle alterazioni del ritmo di fondo. Va sottolineato che le alterazioni EEG dei due tipi sono state conteggiate indipendentemente, quindi la stessa epoca che conteneva entrambi i tipi di alterazione poteva essere assegnata ad entrambi i gruppi. Infine tutti i dati sono stati riassunti in formato tabellare e analizzati con finalità cliniche.

Per entrambi i suddetti gruppi di alterazioni EEG il cut-off della significatività clinica relativa alle alterazioni elettroencefalografiche ricercate quali, l'attività parossistica inter-ittale (focale, multifocale o diffusa) e la presenza, associata o meno alla precedente, dell'alterazione del ritmo di fondo, con la comparsa di frequenze delle bande Delta e Theta di ampiezza significativa, è stata fissata arbitrariamente al 5 % delle epoche EEG analizzate.

Sulla base delle indicazioni presenti nelle linee guida "International Veterinary Task Force Consensus Proposal: diagnostic approach to epilepsy in dog" (De Risio, 2015), cioè facendo riferimento sui risultati combinati dei risultati degli esami Neurologico, MRI e LCR, i cani sono stati divisi in due gruppi: quello dei soggetti risultati positivi al test Reference Standard per l'epilessia idiopatica e quello dei soggetti negativi allo stesso test. Quindi, nel primo gruppo sono stati inseriti i cani risultati esenti sia da evidenti alterazioni MRI riferibili a patologie cerebrali sia da alterazioni infiammatorie evidenti all'esame del LCR. Nel secondo gruppo sono stati inseriti i cani esenti da epilessia idiopatica, cioè quelli che avevano evidenti alterazioni MRI riferibili a patologie cerebrali o alterazioni infiammatorie del liquor oppure entrambe contemporaneamente.

Successivamente ognuno dei due gruppi è stato suddiviso ulteriormente in due sottogruppi sulla base degli esiti dell'EEG: del primo di ognuno dei due sottogruppi facevano parte i soggetti che erano risultati positivi all'index test (EEG) per l'epilessia idiopatica, mentre nel secondo erano inseriti quelli che risultavano negativi allo stesso index test (EEG). Gli elementi semeiologici che differenziavano le due categorie EEG+ e EEG- per l'epilessia idiopatica erano rispettivamente nel primo caso la presenza di attività parossistica inter-ittale focale o diffusa in più del 5% delle epoche associata ad assenza di alterazioni del ritmo di fondo, e nel secondo caso la presenza di alterazioni focali non parossistiche o generalizzate del ritmo di fondo in più del 5% delle epoche, indipendente dalla presenza di concomitante attività

parossistica interittale focale o diffusa, o in subordine la mancanza di qualsiasi forma di alterazione EEG.

#### 4.7 Risultati

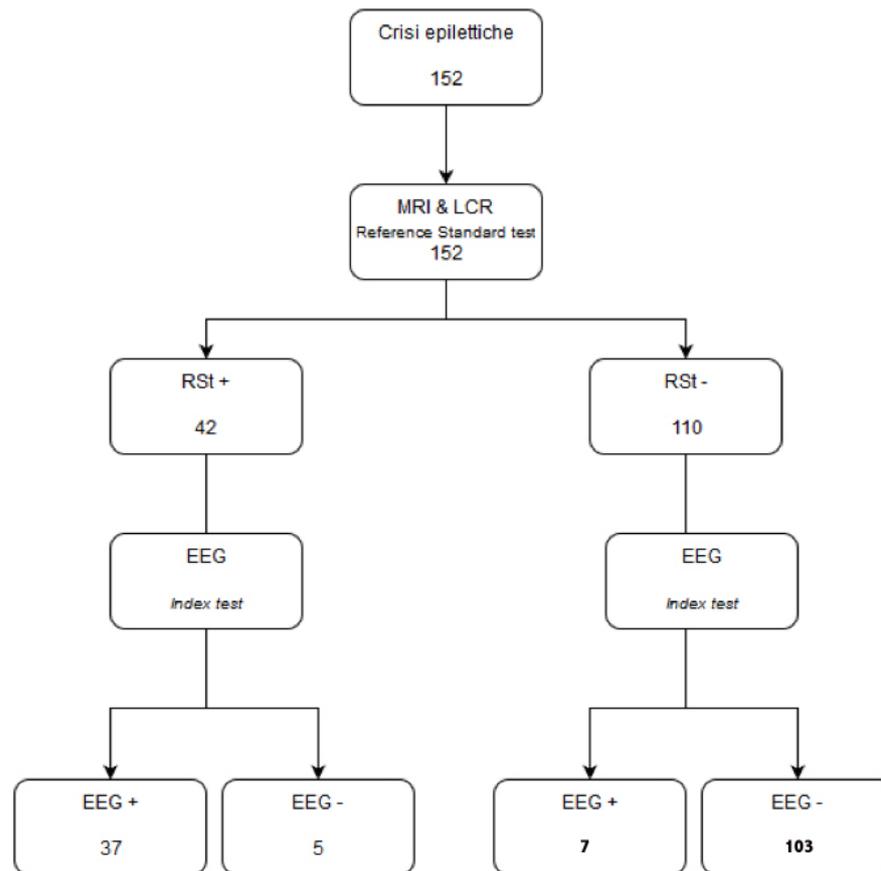


Figura 29. Schema di flusso indicante il numero dei soggetti appartenenti ai vari gruppi e il percorso diagnostico seguito da ognuno.

Come risulta indicato dal diagramma di flusso (Fig. 29) e dalla tabella 2x2 (Tab. 1) in cui sono stati inseriti i risultati dei 152 soggetti inclusi nello studio, 42 erano positivi al test Reference Standard, cioè erano soggetti che pur avendo manifestato crisi epilettiche ricorrenti non mostravano alterazioni encefaliche strutturali evidenziabili

alla RMN o non avevano alterazioni del LCR, mentre i restanti 110 erano negativi, cioè mostravano le suddette alterazioni.

Fra i soggetti positivi al Reference Standard test quelli positivi anche all'Index test (42), cioè quelli con presenza di attività parossistica e assenza di attività lenta di fondo erano 37, mentre quelli negativi anche all'Index test, cioè i soggetti che non manifestavano né alterazioni strutturali né elettroencefalografiche parossistiche e del ritmo di fondo, erano 5. Fra quelli negativi al Reference Standard test (110), 103 erano anche negativi all'Index test, cioè erano soggetti che avevano sia alterazioni strutturali encefaliche sia alterazioni elettroencefalografiche del ritmo di fondo associate o meno anche ad attività parossistica, mentre 7 erano positivi all'index test, cioè oltre alle alterazioni strutturali avevano anche alterazioni elettroencefalografiche con presenza di attività parossistica.

	Reference Standard +	Reference Standard -	Tot
EEG +	37	7	44
EEG -	5	103	108
<b>Tot</b>	<b>42</b>	<b>110</b>	<b>152</b>

*Tabella 1. Il Reference Standard test (RS) per l'epilessia idiopatica nel cane è stato considerato positivo (+) quando sono risultati negativi (-) sia la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) sia l'esame del Liquido Cefalo Rachidiano (LCR). Tutte le altre possibili combinazioni dei risultati del RSt sono state considerate negative (-) per la diagnosi di epilessia idiopatica canina: RM+ e LCR+; RM+ e LCR-; RM- e LCR+. L'index test, nella tabella indicato con EEG, è risultato positivo in caso di presenza significativa di alterazioni parossistiche inter-ittali, mentre è stato considerato negativo per la presenza di alterazioni del ritmo di fondo o per rallentamenti focali delle frequenze dominanti statisticamente rilevanti, o anche in caso di assenza di alterazioni.*

#### 4.8 Stime di accuratezza diagnostica

Sulla base dei risultati ottenuti, al fine di valutare l'accuratezza diagnostica dell'elettroencefalografia eseguita nella fase inter-ittale utile nella diagnosi di epilessia idiopatica canina, sono stati calcolati gli indici predittivi dei segni positivo (IPP) e negativo (IPN), unitamente alle sensibilità (SB) e specificità (SP) diagnostiche per l'Index test in questione (EEG).

L'indice predittivo del segno positivo indica la probabilità che un soggetto positivo all'Index test (EEG+) sia veramente affetto da epilessia idiopatica, mentre quello del segno negativo indica la probabilità che un soggetto con negatività all'Index test (EEG-) sia veramente esente dalla malattia. La sensibilità esprime la probabilità che un soggetto affetto dall'epilessia idiopatica presenti positività all'Index test (EEG con presenza di attività parossistica e assenza di attività lenta), mentre la specificità indica la probabilità che un soggetto non affetto da epilessia idiopatica presenti negatività all' Index test (EEG con presenza di attività lenta o assenza di rilievi).

Il calcolo dei suddetti indici per l'epilessia idiopatica ha fornito i seguenti valori:

- **Indice predittivo del segno Positivo (IPP):**  $\frac{37}{44} = 0,84$
- **Indice Predittivo del segno Negativo (IPN):**  $\frac{103}{108} = 0,95$
- **Sensibilità (SB):**  $\frac{37}{42} = 0,88$
- **Specificità (SP):**  $\frac{103}{110} = 0,94$

#### 4.9 Discussione

Attualmente l'EEG nel percorso diagnostico dell'epilessia idiopatica canina è considerato un test add-on o di terzo livello, cioè da eseguire sempre successivamente all'impiego della RMN e dell'esame LCR, così come indicato in "International Veterinary Task Force Consensus Proposal: diagnostic approach to epilepsy in dog" (De Risio, 2015). Tale posizionamento del test risiede, secondo gli autori delle suddette linee guida, nella mancanza di lavori standardizzati e significativi sull'argomento, oltre che nella scarsità di risorse diagnostiche disponibili nella pratica clinica, e comunque auspicano un aumento delle ricerche in questo campo considerato di grande interesse per la Neurologia Veterinaria.

Questo lavoro si inserisce timidamente in questo contesto tentando di colmare alcune lacune sull'argomento ed in particolare quelle sulla fattibilità del test e sulla sua accuratezza diagnostica. Infatti, nonostante sia un lavoro preliminare e con un basso numero di soggetti utilizzati, il protocollo diagnostico EEG impiegato è risultato fattibile clinicamente, ripetibile tecnicamente, e di costo modesto rispetto agli altri test considerati, e inoltre, dall'analisi dei risultati emergono alcune importanti informazioni utili all'implementazione del test in studio nella pratica clinica corrente. Dall'analisi degli indici di accuratezza diagnostica dell'esame EEG inter-ittale nella diagnosi di Epilessia Idiopatica Canina emergono la grande sensibilità con la capacità di diagnosticare l'88% dei veri soggetti ammalati, e il significativo valore dell'indice predittivo del segno negativo, il quale indica che il 95% dei soggetti che presentano negatività al test sono effettivamente esenti da malattia.

Inoltre, esaminando questi valori da una prospettiva diversa, si potrebbe dire "capovolta" risulta che da un punto di vista diagnostico sarebbe ancora più interessante utilizzare il test EEG nella diagnosi di epilessia canina sintomatica. Infatti, per questa condizione patologica la sensibilità del test aumenterebbe, diventando addirittura 0,94, con un indice predittivo del segno negativo sempre pari a 0,95.

Tali risultati potrebbero, se in futuro confortati da ulteriori e più approfonditi studi sull'argomento, portare a posizionare l'Elelettroencefalografia come test da utilizzare al secondo livello di confidenza nella diagnosi dell'epilessia idiopatica canina, cioè prima della diagnostica per immagini avanzata. Tale condizione, cioè l'utilizzo dell'EEG come test di screening, potrebbe avere un senso compiuto e ancora più interessante se nel procedimento decisionale diagnostico dell'epilessia canina dovessero essere presi in considerazione anche elementi di tipo economico e sociale. Per concludere, dai risultati di questo studio emerge la grande potenzialità dell'elettroencefalografia come strumento diagnostico nelle epilessie canine e si spera che in futuro possa essere estesa ad altre patologie e implementata anche in altre specie animali.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Adamiak Z**, Jaskolska M, Matyjasik H, Pomianowski A, Kwiatkowska M. Magnetic resonance imaging of selected limb joints in dogs. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2011; 14(3):501-5.

**Adrian E. D.**, Matthew B.H.C.; The Berger Rhythm: Potential Changes from the Occipital Lobe of Man, Brain 57, 1934a, pp- 355-84.

**Adrian ED**, Matthews BHC.; The interpretation of potential waves in the cortex. J Physiol (Lond) 1934b; 81:440-71.

**Aguggini G.**, Beghelli V., Giulio L.; CAP 4: "Il sistema nervoso" in Fisiologia degli animali domestici. Con elementi di etologia, 1994, pp. 98-155.

**Ajmone-Marsan C.**; Electrographic aspects of 'epileptic' neuronal aggregates, in "Epilepsia", 1961, II, pp. 22-38.

**Amantea G.**; Rapporto fra eccitamenti afferenti ed epilessia sperimentale, in "Bollettino dell'Accademia Medica", 1920, VIII, pp. 46-121.

**Armocida G.**, Bicheno E., Fox B., Musitelli S.; 1993, Storia della medicina, Enciclopedia tematica, Editore Jaca book, ISBN 88-16-43912-2, pp. 123-127.

**Badaway R.A.B**, Freestone D. R., Lai A., Cook M. J.; Epilepsy: ever-changing states of cortical excitability, Neuroscience 2012, VOL. 222, pp. 89–99.

**Brinkmann H. B.** , Patterson E. E., Vite V., Vasoli V. M., Crepeau D., Stead M., Howbert J. J., Cherkassky V., Wagenaar J. B., Litt B., Worrell G. A; Forecasting Seizures Using Intracranial EEG Measures and SVM in Naturally Occurring Canine Epilepsy, PLOS ONE, 2015, 11(5): e0156476. doi: 10.1371/journal.pone.0156476.

**Bentivoglio M.**, Mazzarello P.; Cap 44. "History of neurology in Italy" in: Handbook of clinical neurology. History of neurology, Finger, Boller, Tyler, 3th ed., 2010, pp 719-736.

**Berendt M.**, Hogenhaven H, Flagstad A, Dam M; Electroencephalography in dogs with epilepsy: similarities between human and canine findings, *Acta Neurol Scand*, 1999, Vol 99, pp. 276-283.

**Berendt M.**, Gredala H., Alvingb J.; Characteristics and phenomenology of epileptic partial seizures in dogs: similarities with human seizure semiology, *Epilepsy Research* 61, 2004, pp. 167–173.

**Berendt M.**, Gulløv C. H., Fredholm M., Focal epilepsy in the Belgian shepherd: evidence for simple Mendelian inheritance, *Journal of Small Animal Practice*, 2009, Vol. 50, pp. 655–661.

**Berendt M.**, Farquhar R. G., Mandigers P. J. J., Pakozdy A., Bhatti S. F. M., De Risio L., Fischer A., Long S., Matiasek K., Muñana K., Patterson E. E., Penderis J., Platt S., Podell M., Potschka H., Pumarola M. B., Rusbridge C., Stein V. M., Tipold A., Volk H. A.; International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals, *BMC Veterinary Research*, 2015, 11:182, DOI: 10.1186/s12917-015-0461-2.

**Berg A. T.**; Cap 1: “Definitions and Classifications of Epilepsies: Overview”. In: *Atlas of epilepsies*, Benbadis S.R., Beran R.G., Berg A.T., Engel Jr., J., Galanopoulou A.S., Kaplan P.W., Koutroumanidis M., Moshe S.L., Nordli Jr. D.R., Serratos J.M., Sisodiya S.M., Tatum W.O., Valeta T., Wilner A. Editors: Editor-in-chief: Panayiotopoulos, C. P., 2010a, pp. 3-4.

**Berg A. T.**, Berkovic S. F., Brodie M.J., Buchhalter J., Cross J. H., Van Emde Boas W., Engel J., French J., Glauser T. A., Mathern G. W., Moshé S. L., Nordli D., Plouin P., Scheffer I. E.; Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. 2010b, *Epilepsia* 51, 676–685.

**Bergamasco L.**, Accantino A., Jaggy A.; Methodical approach to digital electroencephalography and its use in veterinary medicine, *Veterinaria*, 1999, Vol 13 (5), pp. 7-22.

**Bergamsco L.**, Accantino A., Priano L., Neiger-Aeschbacher G., Cizinauskas S., Jaggy A.; Quantitative electroencephalographic findings in beagles anaesthetized with propofol, *The Veterinary Journal*, 2003, Vol 166, pp. 58–66.

**Berger H.**; Uber das elektrenkephalogramm des menschen. *Arch. Psychiatr Nervenkr* 1929; 87:527-70.

**Bjork C. A.**; Circulostatic cerebral hypoxic epilepsy (clinica entity or idiopathic epilepsy?), *Vet. Med. Small Anima. Clin.*, 1970,vol 65(1), pp. 33-37.

**Blume-Chaire W.T.**, Luders H. O., Mizrahi E., Tassinari C., van Emde Bias W., Engel J. Jr., Ex-officio; Glossary of Descriptive Terminology for ictal semiology: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology, *Epilepsia*, 2001, 42(9): 1212-1218.

**Brauer C.**, Jambroszyk M., Tipold A.; Metabolic and toxic causes of canine seizure disorders: A retrospective study of 96 cases, *The Veterinary Journal*, 2011a, vol 167, pp. 272–275.

**Brauer, C.** et al. Electroencephalographic recordings in dogs suffering from idiopathic and symptomatic epilepsy: Diagnostic value of interictal short time EEG protocols supplemented by two activation techniques, 2011b, *The Veterinary Journal*, pp. 1-8.

**Canese R**, Podo F.; Introduzione alla risonanza magnetica ad uso clinico. Principi fisici e strumentazione. *Ann. Ist. Super. Sanità*. 1994;30(1):7-29.

**Carpi F.**, De Rossi D.; CAP 17: “Potenziali elettroencefalografici e potenziali evocati” In “Fenomeni Bioelettrici”, 2007, <http://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/11.Potenziali%20evocati%20e%20EEG.pdf>.

**Caton R.**, The Electric Currents of the brain, *British Medical Journal*, 2, 1875, p. 278.

**Cauduro A.**, Dondi M., Favole P., Opreni M., Lorenzo V.; Artefacts during EEG recording, 2017.

**Chrisman CL.**; Problems in Small Animal Neurology, 1991, No. ed. 2, ISBN : 0812113497.

**Clementi A.**; Stricnizzazione della sfera corticale visiva ed epilessia sperimentale da stimoli luminosi e acustici, in "Archivio di fisiologia", 1929, XXVII, pp. 356-414.

**Collura T. F.**; History and Evolution of Electroencephalographic Instruments and Techniques, Journal of Clinical Neurophysiology, 1993, 10(4):476-504.

**Compston A.**; The Berger rhythm: potential changes from the occipital lobes in man, Brain. 2010 Jan;133(Pt 1):3-6.

**De Deyn PP**, Marescau B, MacDonald RL.; Epilepsy and the GABA-hypotesis a bruief review and some examples. Acta Neurological Belgica, 1990, 90(2):65-81.

**De Risio L.**, Bhatti S., Muñana K., Penderis J., Stein V., Tipold A., Berendt B., Farquhar R., Fischer A., Long S., Mandigers P. J. J., Matiasek K., Packer K. M. A., Pakozdy A., Patterson N., Platt S., Podell M., Potschka H., Batlle M., Rusbridge C., Volk H. A; International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs, BMC Veterinary Research, 2015, 11:148, DOI: 10.1186/s12917-015-0462-1.

**De Risio L.**; Cap 1: "Pathophysiology of Seizure Activity". In: De Risio L., Platt SR Canine and feline epilepsy: diagnosis and management, 2014a, pp 1-27.

**De Risio L.**; Cap 3: "Classification of Seizures and Epilepsies" In: De Risio L., Platt SR, Canine and feline epilepsy: diagnosis and management, 2014b, pp 39-53.

**Easton M. D.**, The seat of abstinic epilepsy, Read at the meeting of the American Neurological Association, New York, 1892, Vol. 22, pp. 1-23.

**Elsberg C. A.**, Stookey B. P.; Studies on epilepsy, I. Convulsions experimentally produced in animals compared with convulsive states in man a preliminary report, Arch neurpsych., 1923, 9(5), pp. 613-626.

**Engel J. Jr.;** Report of the ILAE classification core group, 2006, *Epilepsia*, DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.00215.x.

**Fisch B. J.;** Fisch and Spehlmann's EEG Primer Basic Principles of Digital and Analog EEG, 3° Ed., 1999, Editore Elsevier Health Sciences.

**Fischer, J.;** Electron microscopic changes in the perikarya and in the processes of ganglion cells in the cobalt gelatine epileptogenic focus, in "Physiologia bohemoslovenica", 1969, XVIII, pp. 387-394.

**Fisher R.S,** van Emde Boas W., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., Engel J. Jr; Epileptic Seizures and Epilepsy: Definition Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE), *Epilepsia*, 2005, 46 (4): 470-472.

**Fox M. W.,** Stone A. B. J.; An Electroencephalographic Study of Epilepsy in the Dog, *Small Anim. Pract.* 1967, Vol. 8, pp. 703-708.

**Gavin PR.** Growth of clinical veterinary magnetic resonance imaging. *Veterinary radiology & Ultrasound.* 2011; 52(1): S2-S4.

**Gibbs, F. A.;** Gibbs, E. L. Oxford, England: F. A. Gibbs; Atlas of electroencephalography, Boston City Hospital Atlas of electroencephalography, 1941, p. 221.

**Gloor P.,** Fariello R.G.; Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy, *Trends Neurosci.* 1988 Feb;11(2):63-8.

**Gozzano M.,** Ricerche sui fenomeni elettrici della corteccia cerebrale. *Riv Neurol*, 1935; 8:221-261.

Hauptmann, A., Luminal bei Epilepsie, in "Münchener medizinische Wochenschrift", 1912, LIX, pp. 1907-1909.

**Holliday T.A.,** Williams D.C.; Clinical Electroencephalography in Dogs. *Veterinary Neurology and Neurosurgery Journal*, Vol 1 (1), 1999, pp. 1-38.

**Holliday T. A.,** Williams C., Clinical electroencephalography in dogs, 2006, <http://www.neurovet.org/HollidayandWilliamsEEG/HollidayandWilliamsEEG.htm>.

**Hülsmeier V-I.,** Fischer A., Mandigers P. J. J., De Risio L., Berendt M., Rusbridge C., Bhatti S. F. M., Pakozdy A., Patterson E. E., Platt S., Packer S. M. A., Volk International H. A; Veterinary Epilepsy Task Force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs, BMC Vet Res. 2015; 11: 175.

**Hülsmeier V.,** Zimmermann R, Brauer C, Sauter-Louis C, Fischer A.; Epilepsy in border collies: clinical manifestation, outcome and mode of inheritance. Vet Intern Med. 2010, 24(1):171-8.

**Iannaccone S.;** Cap I: "Etimologia e dintorni" In: La luna, il sangue, l'incenso. Intervista sull'epilessia tra scienza e mito. A cura di Claudio d'Aquino, Iannaccone S., Alfredo Guida Editore, 2000a, pp. 12-17.

**Iannaccone S.;** Cap IV: "I Romani"; In: La luna, il sangue, l'incenso. Intervista sull'epilessia tra scienza e mito. A cura di Claudio d'Aquino, Iannaccone S., Alfredo Guida Editore, 2000b, pp 90-106.

**Jackson, J. H.,** A study of convulsion, in "Transaction of the St. Andrews Medical Graduates Association", 1870, III, pp. 1-45 reprint: Selected writings of J. H. Jackson, a cura di J. Taylor, London 1931, pp. 8-36.

**James F.;** "Introduction to Electroencephalography" In: De Risio L., Platt SR Canine and feline epilepsy: diagnosis and management, 2014, pp. 325-346.

**Jasper H. H.,** Basic Mechanisms of the Epilepsies, a cura di Massimo Avoli, Montreal Neurological Institute and Departments of Neurology & Neurosurgery and of Physiology, McGill University, 2012, Montréal, H3A 2B4 Québec, Canada.

**Jasper H.,** The ten twenty electrode system of the international federation, Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 1958, Vol. 10, pp. 371-375.

**Kamp A.**, Pfurtscheller G., Edlinger G., Lopes da Silva F.; “Technological Basis of EEG Recording” in De Risio L., Platt SR Canine and feline epilepsy: diagnosis and management, 2014, pp. 127-138.

**Kaplan P. W.**, Tatum W. O.; Cap 4: “Seizures” In: “Handbook of EEG interpretation”, William O. Tatum, IV ed., 2008, ISBN-13: 978-1-933864-11-2 (pbk. : alk. paper), pp. 97-120.

**Kis A.**, Szakadát S., Kovács E., Gácsi M., Simor P., Gombos F., Topál J., Miklósi A., Bódizs R.; Development of a non-invasive polysomnography technique for dogs (*Canis familiaris*), *Physiol Behav.*, 2014, Vol 10 (130), pp. 149-56.

**Klem; C.** “Artifacts”. In: *Current Practice of Clinical Electroencephalography*, Ebersole, J.S. and Pecley, T.A. (eds), 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2003, pp. 271-281.

**Klemm W. H.**, C. L. Hall; Electroencephalographic Pattern Abnormalities in Dogs with Neurologic Disorders, *Am. J. Vet. Res.*, 1972, Vol. 33, No. 10, pp. 2011-25.

**Klemm W. H.**; Attempts to Standardize Veterinary Electroencephalographic Techniques; *Am. J. Vet. Res.*, 1968, Vol. 29, No. 9, pp. 1895-1900.

**Klemm W. R.**, Attempts to Standardize Veterinary Electroencephalographic Techniques, *Am. J. Vet. Res.*, 1968, Vol. 29(9), pp. 1895-1900.

**Lane S. L.**, Bunch S. E.; Medical Management of Recurrent Seizures in Dogs and Cats, *Lane, Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1990, Vol 4(1), pp. 26–39.

**Lehnertz K.**, Andrzejak R. G., Arnhold J., Kreuz T., Mormann F., Rieke C., Widman G., Elger C. E.; Nonlinear EEG Analysis in Epilepsy: Its Possible Use for Interictal Focus Localization, Seizure Anticipation, and Prevention, 2001, *Journal of Clinical Neurophysiology* 18(3):209–222.

**Lipton S. A.,** Rosenberg P.; Excitatory amino acid as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 1994, Vol. 330, pp. 613-622.

**Magliano. G. B.,** Palmirani. R.; *L'epilessia nella storia. Ritratti di famosi epilettici*, Alessandrini Biondi Editore, Milano, 1994.

**March P. M.;** Seizure: Classification, etiologies and pathophysiology, *Clinical techniques in Small animal practice*, Vol 13, No 3 (August) 1998: pp 119-131.

**Mariani C. L.;** Terminology and Classification of Seizures and Epilepsy in Veterinary Patients, 2013, Vol. 28 (2), pp. 34–41.

**Murphy SE,** Ballegeer EA, Forrest LJ, Schaefer SL. Magnetic Resonance Imaging Findings in Dogs with Confirmed Shoulder Pathology. *Veterinary Surgery*. 2008 Oct; 37(7):631-8.

**Musgrave J.,** Gloor P.; The Role of the Corpus Callosum in Bilateral Interhemispheric Synchrony of Spike and Wave Discharge in Feline Generalized Penicillin Epilepsy, *Epilepsia*. 1980 Aug, 21(4):369-78.

**Niedermeyer E.;** CAP 8: "The EEG Signal: Polarity and Field Determination" In "Electroencephalography" Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005a, pp. 161-166.

**Niedermeyer E.,** CAP 9: "The Normal EEG of the Waking Adult" In "Electroencephalography" Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005b, pp. 167-192.

**Niedermeyer E.,** Cap 27 "Epileptic Seizure Disorders". In "Electroencephalography" Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005c, pp. 505-619.

**Nieuwenhuys R;** Cap 3: "Anatomia macroscopica". In "Il sistema nervoso centrale" Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijzen C., 2° ed. italiana a cura di Papa M., Springer 2008a, pp. 67-94.

**Nieuwenhuys R** ; Cap 15: "Telencefalo: neocortex" in "Il sistema nervoso centrale" Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijzen C., 2° ed. italiana a cura di Papa M., Springer 2008b, pp.491-498.

**Noachtar S.**, Binnie C., Ebersole J. S., Manguire F., Sakamoto A. and Westmoreland B.; A glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers and proposal for the report form for the EEG findings. The international Federation of Clinical Neurophysiology. Electroencephalography and clinical Neurophysiology Supplement, 1999, 52, pp. 21-41.

**Nunez I. M. B.;** Cap3: "Electroencephalography" In: EEG artifact detection, Department of Cybernetics Czech Technical University in Prague, 2010, pp. 5-10.

**Passariello R.;** Elementi in tecnologia in radiologia e diagnostica per immagini. 1990, Prima edizione.

**Pellegrino F. C.,** Sica R. E.; Canine electroencephalographic recording technique: findings in normal and epileptic dogs, 2004, Clin Neurophysiol, 115(2):477-87.

**Petsche H.,** Stumpf, Ch., Gogolak, G.; The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. Control of hippocampus arousal activity by septum cells, in "Electroencephalography and clinical neurophysiology", 1962, XIV, pp. 202-211.

**Pike F. H.,** Elsberg C. A.; Studies on epilepsy, II. The occurrence of Clonic convulsive seizure in animals deprived of cerebral motor cortex, American Journal of Physiology, 1925, Vol 72, pp. 337-342.

**Platt. SR;** Pathophysiology of Seizure Activity. In De Risio L., Platt SR Canine and Feline Epilepsy: diagnosis and management. CABI, London (UK), 2014, pp 1-27.

**Podell M.;** "Seizures", In Platt S. and Olby N. (eds) BSAVA Manual of canine and Feline Neurology, 4th Edition. BSAVA, 2013, pp 117-136.

**Potschka H.**, Fischer A., Ruden E.-L. von, Hulsmeyer V., Baumgartner W.; Canine epilepsy as a translational model?, *Epilepsia*, 2013, 54(4), pp. 571–579.

**Pozzi Mucelli R**, Del Maschio A, Carriero A, Colagrande S, Cova M, Mascalchi M, Panebianco V, Polonara G, Scarabino T, Vanzulli A.; *Syllabus risonanza magnetica di base*, 2004. Seconda edizione. Poletto editore.

**Redding R.W.**; Cap 5: “Electrophysiologic diagnosis” In: “Veterinary Neurology”, Oliver J.E., Hoerlein B.F., Mayhew I.G., 1987, Ed W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 111-143.

**Reilly L. E.**; “EEG Recording and Operation of the Apparatus” In De Risio L., Platt SR *Canine and feline epilepsy: diagnosis and management*, 2014, pp. 139-159.

**Rodenbeck A.**; A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition in according to Rechtschaffen and Kales et al., *Somologie*, 2006, Vol. 10 (4), pp. 159-175.

**Roselli A.**; “La malattia sacra” di Ippocrate, Marsilio Editore, 1996, EAN: 9788831761932.

**Rotterdam F. L.**; CAP 5: “Biophysical Aspects of EEG and Magnetoencephalogram Generation”. In: “Electroencephalography” Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005, pp. 107-125.

**Rusbridge C.**; Neurological diseases of the Cavalier King Charles spaniel, *J Small Animal Practice*, 2005, 46(6): 265-272(8).

**Schaefer SL**, Forrest LJ. Magnetic Resonance Imaging of the Canine Shoulder: an Anatomic Study. *Veterinary Surgery*. 2006 Dec; 35(8):721-8.

**Speckmann E.J.**, Elger C. E., CAP 2: “Introduction to the Neurophysiological Basis of the EEG and DC Potentials” “Electroencephalography” Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005, pp. 18-29.

**Stafstrom C. E.;** Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science, *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 2006, vol. 26, pp. 983-1004.

**Steriade M.;** CAP 3: “Cellular Substrates of Brain Rhythms” in “Electroencephalography” Niedermeyer, Ernst; da Silva, Fernando Lopes, 5th Ed., 2005, pp. 31-83.

**Swanson L. W.;** Cap 1: “How the Brain Works: Structure and Function” in *Brain Architecture*, 2° ed., Oxford University Press, 2012a, pp. 2-8.

**Swanson L. W.,** Cap 2: “The Simplest Nervous Systems: Neurons, Nerve Nets, and Behavior” in *Brain Architecture*, 2° ed., Oxford University Press, 2012b, pp.9-28.

**Tatum W. O.;** Cap 1: “Normal EEG”. In: “Handbook of EEG interpretation”, William O. Tatum, IV ed., 2008a, ISBN-13: 978-1-933864-11-2 (pbk. : alk. paper), pp. 1-50.

**Tatum W. O,** Benbadis S. R; Cap 3: “Epileptiform Abnormalities” In: “Handbook of EEG interpretation”, William O. Tatum, IV ed., 2008b, ISBN-13: 978-1-933864-11-2 (pbk. : alk. paper), pp 71-96.

**Thomson C.,** Hahn C.; Cap 1: “Regional neuroanatomy” in *Veterinary Neuroanatomy*, Thomson C., Hahn C., Ed. Saunders Elsevier, 2012, pp. 1-9.

**Tiira K.,** Hakosalo O., Kareinen L., Thomas A., Hielm-Björkman A., Escriou C., Arnold P.; Environmental Effects on Compulsive Tail Chasing in Dogs, 2012, Plos One, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041684>.

**Trachtenberg M. C.,** Pollen D. A.; “Neuroglia. Biophysical properties and physiologic function” in “*Science*”, 1970, CLXVII, pp. 1248-1251.

**Vanhatalo S.,** Voipio J., Kaila K.; Full-band EEG (FbEEG): an emerging standard in electroencephalography, *Clinical Neurophysiology*, 2005, pp. 1–8.

**Volk HA.;** Pathophysiology of Pharmacoresistant Epilepsy, In: De Risio L., Platt SR Canine and feline epilepsy: diagnosis and management, 2014, pp 28-38.

**Walter W. G.;** The Electro-encephalogram in Cases of Cerebral Tumour (Section of Neurology), Proc R Soc Med. 1937 Mar 30(5): 579–598.

**Walter W. G.;** Electro-encephalography in cases of sub-cortical tumour, J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1944 Jul; 7(3-4): 57–65.

**Walter W. G.;** The location of cerebral tumors by electro-encephalography, W Grey Walter, M.A. Camb, 1969, Vol9, No 4, pp 147-154.

**Wetherington J.,** Serrano G., Dingledine R.; Astrocytes in the Epileptic Brain, Neuron. 2008 Apr 24; 58(2): 168–178. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.002.

**Wilner A. N.;** Neuroimaging and epilepsy: state of art, Medscape, 2013, pp. 1-4.

**Wrzosek M.,** Płoneka M., Nicpońb J., Cizinauskasc S., Pakozdyd A.; Retrospective multicenter evaluation of the “fly-catching syndrome” in 24 dogs: EEG, BAER, MRI, CSF findings and response to antiepileptic and antidepressant treatment, 2015, Epilepsy & Behavior, Vol. 53, pp. 184–189.

**Young G. B.,** Campbell V. C.; EEG monitoring in the intensive care unit: pitfalls and caveats. Journal of Clinical Neurophysiology, 1999, 16, pp. 40-45.