



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PSICOBIOLOGIA E
NEUROSCIENZE COGNITIVE**

**ATTIVAZIONE DEL SISTEMA
SPECCHIO DURANTE UN COMPITO
DI IMITAZIONE DI AZIONI IN
PAZIENTI CON MALATTIA DI
ALZHEIMER E MILD COGNITIVE
IMPAIRMENT: UNO STUDIO fMRI**

Relatore:

***Chiar.mo Prof.* LEONARDO FOGASSI**

Controrelatore:

***Chiar.mo Dott.* ANTONINO ERRANTE**

Laureanda:

CARMELA GINOLFI

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

ABSTRACT (ITA).....	1
ABSTRACT (ENG).....	2
1. MALATTIA DI ALZHEIMER (AD): DESCRIZIONE E CENNI STORICI	3
1.1 Quadro clinico	5
1.2 Patologia	8
1.3 Eziologia.....	12
1.4 Sintomi Cognitivi e Sintomi Comportamentali dell'AD	14
1.5 Strumenti diagnostici	16
1.6 Trattamenti terapeutici standard	19
2. SISTEMA SPECCHIO: DALLE ORIGINI ALL'UOMO.....	22
2.1 Scoperta dei neuroni specchio.....	22
2.2 Il sistema specchio nell'uomo: un sistema per la codifica delle intenzioni	25
2.3 Le basi neurali dell'imitazione e dell'apprendimento motorio	33
2.4 Sistema specchio e AD: prime evidenze comportamentali e di neuroimaging.....	36
OBIETTIVI DELLO STUDIO E IPOTESI	43
3. MATERIALI E METODI	45
3.1 Partecipanti	45
3.2 Valutazione neuropsicologica	46
3.3 Disegno Sperimentale dello studio fMRI	48
3.3.1 Compito di osservazione (OBS)	49
3.3.2 Compito di imitazione di azioni (IMI).....	51
3.4 Acquisizione dei dati di risonanza magnetica	56
3.5 Valutazione video-based dei dati comportamentali acquisiti durante la sessione di risonanza magnetica.....	57
3.6 Analisi statistiche dei dati comportamentali e fMRI	66
4. RISULTATI	68
4.1 Risultati della valutazione neuropsicologica	68
4.2 Risultati dell'analisi comportamentale video-based.....	73
4.3 Risultati fMRI	79
4.3.1 Osservazione di azioni: risultati	79
4.3.2 Imitazioni di azioni: risultati.....	82
4.3.3 Relazione tra attivazione funzionale e performance comportamentale	86
DISCUSSIONE	89

CONCLUSIONI.....96
BIBLIOGRAFIA.....99

ABSTRACT (ITA)

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta la causa più frequente di demenza nel mondo, termine generico utilizzato per descrivere un declino delle facoltà mentali sufficientemente grave da interferire con la vita quotidiana, tanto da essere considerata dal British Medical Journal una “nuova, silente epidemia”. Essa è caratterizzata primariamente dalla presenza di deficit cognitivi e comportamentali progressivi che intaccano, soprattutto nelle fasi iniziali, la memoria episodica, per poi estendersi successivamente agli altri domini. Strutturalmente, il cervello va incontro ad una massiccia perdita di volume, e dunque ad atrofia che, parallelamente all’aggravamento dei deficit cognitivi, coinvolge soprattutto i lobi temporo-mesiali e parietali con relativa conservazione delle aree frontali. La AD è tipicamente preceduta dalla fase clinica di Mild Cognitive Impairment (MCI), deficit cognitivo lieve che può interessare diversi domini cognitivi senza impattare gravemente sulle attività della vita quotidiana.

Anche se l'AD e l'MCI sono state finora caratterizzate come malattie "cognitive", nell'ultimo decennio è stato sempre più riconosciuto un legame tra la funzione motoria e il rischio di sviluppare l'AD. Attualmente, pochi studi in letteratura sembrano aver indagato il comportamento motorio dei pazienti AD, e soprattutto la loro capacità imitativa, che, da un punto di vista neurofisiologico, è supportata dall'integrità del sistema fronto-parietale dei neuroni specchio. Nella prima parte del presente lavoro verrà approfondito il quadro clinico dell'AD e verrà fornita una panoramica sul Sistema Specchio e sul suo importante ruolo nell'imitazione. Successivamente, verranno descritti la parte metodologica e i risultati dello studio sperimentale. Esso consiste in uno studio fMRI volto a indagare l'attivazione cerebrale del Sistema Specchio in pazienti MCI, in pazienti AD di grado lieve e in individui sani di pari età, durante un compito di osservazione-imitazione di azioni complesse bimanuali, consistente in passaggi e pieghe su un foglio di carta per formare un origami. Nel complesso, i risultati del presente studio mostrano che i pazienti AD e MCI sono in grado di imitare azioni complesse e che il compito di imitazione attiva il Sistema Specchio, sebbene in modo diverso rispetto ai soggetti sani. Verrà approfondita, inoltre, la relazione tra attivazione funzionale della DLPFC (corteccia prefrontale dorsolaterale) e performance imitativa. Nella discussione, oltre ad un commento critico sui risultati e un confronto con la letteratura riguardante compiti di imitazione, viene proposto un possibile utilizzo della terapia basata sull'osservazione/ripetizione di azioni (AOT) anche nei pazienti appartenenti al continuum della malattia di Alzheimer.

ABSTRACT (ENG)

Alzheimer's disease (AD) represents the most frequent cause of dementia in the world - a generic term used to describe a decline in mental faculties severe enough to interfere with daily life - so much so that it is considered a "new, silent epidemic" by the British Medical Journal. It is characterized primarily by the presence of progressive cognitive and behavioral deficits that affect, especially in the early phases, episodic memory, and then later extend to the other domains. Structurally, the brain goes through massive volume loss, and thus atrophy, which, in parallel with the worsening of cognitive deficits, involves mainly the temporo-mesial and parietal (precuneus) lobes with relative preservation of the frontal areas. AD is typically preceded by the clinical phase of Mild Cognitive Impairment (MCI), which may affect several cognitive domains but without severely impacting activities of daily living.

Although AD and MCI have so far been characterized as "cognitive" diseases, a link between motor function and the risk of developing AD has been increasingly recognized in the last decade. Currently, few studies in the literature have investigated the motor behavior of AD patients and especially their imitative ability, which, from a neurophysiological point of view, is supported by the integrity of the fronto-parietal mirror neuron system. In the first part of the present work, the clinical picture of AD will be discussed in depth and an overview of the Mirror System and its important role in imitation will be provided. Next, the methodological part and the results of the experimental study will be described. It consists of an fMRI study aimed at investigating the brain activation of the Mirror System in MCI patients, mild AD patients and healthy individuals of the same age, during an observation-imitation task of complex bimanual actions, consisting of steps and folds on a sheet of paper to form an origami. Overall, the results of the present study show that AD and MCI patients are able to imitate complex actions and that the imitation task activates the Mirror System, although in a different way than healthy individuals. The relationship between functional activation of the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and imitative performance will also be explored. In the discussion, in addition to a critical commentary on the results and a comparison with the literature concerning imitation tasks, a possible use of action observation/repetition (AOT)-based therapy is also proposed in patients belonging to the Alzheimer's disease continuum.

1. MALATTIA DI ALZHEIMER (AD): DESCRIZIONE E CENNI STORICI

Nel 1907 Alois Alzheimer, psichiatra e neuropatologo tedesco, descrisse il caso di una donna di 51 anni, Auguste Deter, con evidenti problemi di memoria, di linguaggio ed esecutivi, affetta da una demenza progressiva, caratterizzata sul piano neuropatologico da peculiari alterazioni cerebrali.

La *demenza* è un termine generico utilizzato per descrivere un declino delle facoltà mentali sufficientemente grave da interferire con la vita quotidiana (Lane et al., 2018).

Per lungo tempo la malattia di Alzheimer fu considerata una rara demenza presenile, intesa come un deterioramento progressivo delle funzioni intellettive e mentali di un individuo che ha raggiunto uno stadio completamente sviluppato. Negli anni '70 una serie di studi dimostrarono che la demenza presenile di Alzheimer e la demenza senile avevano la medesima sintomatologia e il medesimo substrato patologico, per cui attualmente si ritiene che esista un'unica entità nosologica, denominata "demenza di Alzheimer" (AD).

L'AD rappresenta la causa più frequente di demenza nelle popolazioni occidentali ed è la forma prevalente nella popolazione anziana, interessando circa il 10% degli individui oltre i 65 anni di età e circa il 50% di quelli al di sopra degli 85 (J Garre-Olmo, 2018).

Il British Medical Journal ha parlato di una "nuova, silente epidemia" e Lewis Thomas, scienziato e saggista, non ha esitato a definire l'AD come "malattia del secolo". Difatti, si parla di circa 3.000.000 persone affette negli USA e di circa 600.000 pazienti in Italia, mentre oltre 3 milioni di persone sono direttamente o indirettamente coinvolte nella sua assistenza. La malattia colpisce entrambi i sessi, con predilezione

per le donne (9,3; IC 95% 6,5-12,2) rispetto agli uomini (5,0; IC 95% 3,0-6,9), indipendentemente dalla loro maggiore durata di vita.

Il maggiore fattore di rischio sembra essere l'età, seguito dalla familiarità, che si presenta in due diverse forme. In una minoranza dei casi (1-2%) la malattia è trasmessa in modo dominante, a penetranza completa in tutte le generazioni che sono pesantemente colpite da una forma ad esordio precoce, valutabile intorno ai 30-35 anni in casi estremi, ed aggressiva. Nel 50-60% dei casi esiste una familiarità debole che si esprime nella presenza di due individui affetti in generazioni diverse, suggerendo l'esistenza di polimorfismi genetici che predispongono alla malattia (Rai, 2017). Altri fattori di rischio, che richiedono peraltro una conferma, sono la bassa scolarità e i traumi cranici. Nel primo caso si ipotizza che la scolarità sia direttamente proporzionale al numero di sinapsi corticali, per cui gli individui con alta scolarità avrebbero una riserva biologica e cognitiva più consistente, e un conseguente ritardo nella comparsa di un eventuale demenza. I traumi cranici, d'altro canto, favorirebbero l'accumulo e la deposizione di β -proteina, attraverso meccanismi ancora sconosciuti.

Difatti, nonostante l'enorme sforzo svolto nell'ambito della ricerca e le numerose ipotesi proposte, l'eziologia dell'AD rimane al momento oscura.

Ad oggi è ampiamente accettato che la patogenesi dell'AD comprenda la formazione e deposizione di β -amiloide, di grovigli neurofibrillari e di infiammazione. Tra le ipotesi patogenetiche più studiate negli ultimi anni, quella cosiddetta "amiloidogenica" ha trovato i maggiori riscontri. Secondo questa teoria, il *primum movens* del processo neuropatologico risiederebbe nell'anomala degradazione della proteina precursore dell'amiloide (APP) che porterebbe alla produzione e all'accumulo di un polipeptide neurotossico (Reiss et al., 2018).

Una seconda ipotesi patogenetica nell'AD pone l'attenzione sul ruolo prominente della proteina *tau*. Secondo la teoria "taucentrica", le prime alterazioni si

verificherebbero a carico di questa proteina che subirebbe un'anomala fosforilazione. Tale evento è alla base di una duplice conseguenza: da una parte determina il collasso strutturale del citoscheletro dovuto al distacco della proteina dai microtubuli, dall'altro ne favorisce la precipitazione in grovigli neurofibrillari in grado di provocare un danno meccanico diretto al neurone. Conferma il ruolo centrale della proteina tau nell'AD anche l'evidenza della correlazione che esiste tra il carico lesionale *tau* e il riscontro clinico. Il peggioramento dei sintomi, infatti, sembrano andare di pari passo con la diffusione spaziale della degenerazione neurofibrillare nel cervello (Horie et al., 2021).

1.1 Quadro clinico

La storia clinica dell'AD abbraccia un lungo arco temporale: il progressivo accumulo del danno e il conseguente esaurimento delle capacità dell'encefalo di compensarlo avvengono in maniera molto lenta. Esiste, dunque, un lungo periodo, che alcuni studi stimano compreso tra i 15 e i 30 anni, in cui la patologia è presente, senza però alcuna evidenza di deficit cognitivo. Ciò vuol dire che l'esordio dei sintomi nell'AD è un evento relativamente tardivo nel corso della malattia, preceduto da una lunga fase asintomatica. In quest'ottica l'AD si colloca all'interno di un continuum cognitivo di cui la demenza è la fase finale (Atri, 2019).

La ricerca di indicatori biologici, genetici, biochimici e neuroradiologici che fossero in relazione con l'insorgenza e lo sviluppo dell'AD ha permesso di individuare alcuni biomarcatori utili per la diagnosi in vivo della malattia. L'introduzione di questi biomarcatori nei più recenti criteri diagnostici proposti dal National Institute on Aging - Alzheimer's Association (NIA-AA) nel 2011, ha consentito di aumentare l'accuratezza della diagnosi nell'AD individuando tre categorie diagnostiche che corrispondono a tre diversi gradi di espressione clinica della malattia (Sperling et al., 2011):

1. **AD preclinica:** corrisponde alla fase asintomatica della malattia in cui tutti i meccanismi patogenetici sono in atto, ma l'entità del danno non è tale da determinare lo sviluppo dei sintomi. Difatti, si parla di una fase che il più delle volte sfugge alla diagnosi clinica. Viceversa, tale fase è riscontrabile in pazienti ancora asintomatici ma portatori di mutazioni causative dell'AD. In questa prima fase si osserva calo degli interessi, indifferenza verso i problemi familiari e lavorativi, turbe della memoria che, in genere, vengono minimizzate e attribuite all'affaticamento. È spesso presente, all'esordio, la consapevolezza del calo delle funzioni intellettive e dell'aumentata difficoltà nel mantenimento di accettabili relazioni interpersonali. Ne consegue una reazione depressiva, che, in questo stadio iniziale, può porre problemi di diagnosi differenziali tra depressione e deterioramento mentale.
2. **AD prodromica:** corrisponde alla fase sintomatica iniziale della malattia. Il calo della memoria si rende evidente, così come le modificazioni della personalità: l'attenzione, la capacità di critica e di giudizio, la partecipazione agli avvenimenti sono ridotte, con chiaro scadimento del rendimento lavorativo. La patologia incomincia a raggiungere un livello di danno che intacca relativamente alcune funzioni cognitive in modo lieve e senza che occorra interferenza nel funzionamento globale dell'individuo. In questa fase rientra il Mild Cognitive Impairment (MCI).

MILD COGNITIVE IMPAIRMENT (MCI)

Il Mild Cognitive Impairment (MCI) è una sindrome clinica caratterizzata da un deterioramento delle funzioni cognitive, evidenziabile dai test neuropsicologici, di entità tale da non comportare alcuna limitazione dell'autonomia funzionale individuale (Reisberg et al., 2008). Si tratta di un deficit cognitivo lieve, che può interessare diversi domini cognitivi ma senza impattare sulle attività della vita quotidiana, e dunque non soddisfa i criteri diagnostici per una demenza conclamata. La diagnosi di MCI si basa

sul riscontro di un deficit cognitivo lieve che è maggiore rispetto a quello che ci si aspetterebbe per età e scolarità dell'individuo, ma che non determina alcuna interferenza nello svolgimento dell'attività quotidiana. Come detto, il MCI è una sindrome eterogenea in cui il disturbo cognitivo può riguardare solo la memoria (MCI amnesico) o un'altra funzione cognitiva (MCI non amnesico) e può interessare una singola funzione (MCI-singolo-dominio) o più di una (MCI multi-dominio). La prevalenza del MCI si aggira intorno al 10-20% nella popolazione sopra i 65 anni. Numerosi studi hanno evidenziato come il MCI rappresenti un rilevante fattore di rischio per la successiva insorgenza di demenza.

3. **Demenza di AD:** corrisponde alla fase conclamata della malattia. L'evoluzione peggiorativa diventa consistente. Il livello di alterazione neuropatologica è così grave da compromettere molte funzioni cognitive e il paziente in questa fase incomincia a subire una compromissione dei livelli di autonomia. Il soggetto dimostra gravi turbe mnestiche, anche della memoria a lungo termine. Si accentua progressivamente la mancanza di cura dei propri affari, della propria famiglia, del soddisfacimento dei bisogni corporali e gli oggetti e i familiari spesso non vengono riconosciuti. In questa categoria diagnostica possono essere individuati tre livelli di gravità clinica stabiliti sulla base dei punteggi che i pazienti ottengono a test come il MMSE: lieve ($22 < \text{MMSE} < 27$), moderata ($15 < \text{MMSE} < 21$) e severa ($\text{MMSE} < 14$).

Nello specifico, il MMSE (Mini-Mental State Examination) è un test globale, comunemente utilizzato per rilevare un deterioramento intellettuale. Un punteggio $< 27/30$ è considerato anormale, mentre un punteggio $< 23/30$ è indicativo di demenza (Rodriguez et al., 2021). Questo test deve tuttavia essere interpretato in funzione del livello di istruzione e del contesto clinico nella misura in cui esso può essere perturbato, in assenza di demenza, in un soggetto con un deficit limitato a una funzione strumentale come un'afasia o una sindrome amnesica.

D'altra parte, alcuni studi dimostrerebbero che tale test sia scarsamente sensibile, soprattutto per quanto concerne la valutazione delle funzioni esecutive frontali (Folstein et al., 1982).

La diagnosi clinica di demenza di AD, diversamente dal MCI, si basa sul riscontro di un deficit cognitivo che riguarda la memoria e almeno un'altra funzione. Il deficit deve avere quattro caratteristiche:

1. Esordio subdolo
2. Progressione graduale
3. Determinare la compromissione dell'autonomia del soggetto
4. Essere confermato per mezzo di una valutazione neuropsicologica con test standardizzati.

Il soddisfacimento di questi criteri permette di fare diagnosi di AD *probabile*. Se i criteri non sono tutti soddisfatti si parla di AD *possibile*.

1.2 Patologia

La patologia AD può essere dovuta a diverse cause, quali:

- **Grovigli neurofibrillari di Alzheimer e degenerazioni neurofibrillari:** sono ad oggi considerati lesione cardinale associata ad AD e requisito fondamentale per una diagnosi patologica. Il principale componente biochimico dei grovigli neurofibrillari è rappresentato dalla deposizione di anomale proteine *tau* iperfosforilate. In condizioni normali, la proteina *tau* è strettamente ancorata a microtubuli con funzione di sostegno e stabilizzazione del citoscheletro neuronale. Nell'AD, invece, la proteina *tau* va in contro a un'eccessiva fosforilazione che ne altera la struttura. Queste proteine perdono la loro fisiologica localizzazione assonale e la loro stabile interazione con i microtubuli,

aggregandosi in depositi filamentosi intracellulari, specifici per morfologia, distribuzione subcellulare e contenuto. Tali alterazioni determinano una progressiva destabilizzazione di microtubuli, riduzione del numero delle sinapsi, degenerazione assonale e dendritica, ed infine morte neuronale. Il modello di distribuzione dei grovigli neurofibrillari nell'AD è classicamente riscontrabile nei neuroni della corteccia entorinale, dell'ippocampo, dell'amigdala e degli strati più profondi (III, V e superficie di VI) della neocorteccia (Lane et al., 2018). Si noti che l'entità e la distribuzione dei grovigli neurofibrillari nell'AD è correlato al grado di demenza e alla durata della malattia, suggerendo un'influenza diretta sulle capacità funzionali cerebrali.

- **Placche senili o neuritiche:** costituiscono la seconda lesione patologica cardinale dell'AD. Queste lesioni, che si osservano anche durante il normale processo di invecchiamento, sono presenti in grandi quantità nei pazienti con malattia di Alzheimer. Le placche senili sono complesse strutture extracellulari caratterizzate dalla presenza di un nucleo centrale di fibrille di β -amiloide (circondate da una corona di neuriti (o processi neuronali, o assoni, o dendriti) in via di degenerazione. Queste formazioni sono distribuite in tutta la corteccia, compresa in quella ippocampale e paraippocampale, nell'amigdala e nello striato.
- **Deposizione vascolare di amiloide:** reperto non costante né specifico per AD, si caratterizza per la deposizione di β -amiloide nelle pareti delle piccole arterie e arteriole cerebrali, quali leptomeningi e sostanza grigia corticale (Lane et al., 2018). Nello specifico, l'amiloide $A\beta$ è una proteina costituita da 39-42 aminoacidi che deriva dalla digestione proteolitica di una proteina transmembrana definita precursore proteico dell'amiloide (*amyloid precursor protein*, APP). L'APP ha una funzione neurotrofica e neuroprotettiva, mentre la funzione dell'amiloide $A\beta$ resta sconosciuta. Probabilmente, il momento patologico iniziale che porta alla formazione delle placche neuritiche è la

formazione delle fibrille solubili di amiloide. Nello specifico, la deposizione di β - amiloide non sembra occludere il lume dei vasi o interferire con le loro funzioni. Tuttavia, quando il grado di coinvolgimento vascolare è elevato, vi è una tendenza spontanea alla rottura delle parti dei vasi, con conseguente accumulo di sangue nei tessuti cerebrali. Queste piccole emorragie tendono a verificarsi a livello della sostanza bianca frontale e/o occipitale: esse sono spesso piccole e multiple ma quando sono di grandi dimensioni, evento piuttosto raro, possono rappresentare una delle poche e fatali complicazioni intracerebrali dell'AD.

- **Perdita sinaptica:** nell'AD vi è una significativa riduzione, circa del 45% rispetto a quella osservata in individui sani, del profilo sinaptico cerebrale. Il grado di perdita sinaptica è strettamente correlato con il grado di compromissione significativa. Ciò suggerisce che sia proprio la riduzione sinaptica il principale corrispettivo morfologico della compromissione cognitiva nell'AD. Altre caratteristiche neuropatologiche riscontrate nell'AD, ma con incerto significato, riguardano la *degenerazione granulo vacuolare*, descritta per la prima volta da Simchowitz nel 1911: essa consiste in un raggruppamento di piccoli vacuoli intracellulari ciascuno dei quali contiene granuli dell'interno del citoplasma dei neuroni piramidali dell'ippocampo (tipicamente, tra le porzioni CA1 e CA2) e i *corpi di Hirano*, descritti per la prima volta da Asao Hirano, e che rappresentano lesioni perineuronali a livello dell'ippocampo.

La malattia di Alzheimer è anche correlata a una riduzione dei livelli di varie proteine e neurotrasmettitori. Un deficit neurotrasmettitoriale rilevante, causato da processi degenerativi dei nuclei basali del telencefalo, riguarda l'acetilcolina, l'acetilcolina colinesterasi e i recettori nicotinici dell'acetilcolina (Barage & Sonawane, 2015). La riduzione di tale neurotrasmettitore potrebbe essere correlata alla degenerazione di neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert che proiettano a numerose aree della corteccia. Si rileva, inoltre, anche una riduzione dei livelli di noradrenalina nei nuclei del tronco encefalico e a livello del *locus coeruleus*.

Macroscopicamente, nelle fasi avanzate di malattia, il cervello va incontro ad una massiccia perdita di volume e dunque ad atrofia che, parallelamente all'aggravamento dei deficit cognitivi, coinvolge in maniera omogenea i lobi temporali, frontali, e parietali (Lane et al., 2018). L'atrofia tipicamente esordisce a livello delle strutture temporali mediali - implicate nelle funzioni di memoria - per poi estendersi, progressivamente, all'intera corteccia associativa. I solchi cerebrali e i ventricoli appaiono ingranditi per la perdita di sostanza e il peso e le dimensioni dell'organo risultano gravemente ridotte (Fig.1). Alcuni studi hanno dimostrato che restano relativamente risparmiate da atrofia fino agli stadi più avanzati di malattia aree cerebrali deputate alle funzioni sensoriali e motorie, mentre un'atrofia significativa dell'ippocampo, con associata dilatazione selettiva dell'adiacente corno temporale del ventricolo laterale, rappresenterebbe un reperto fortemente suggestivo per l'AD.

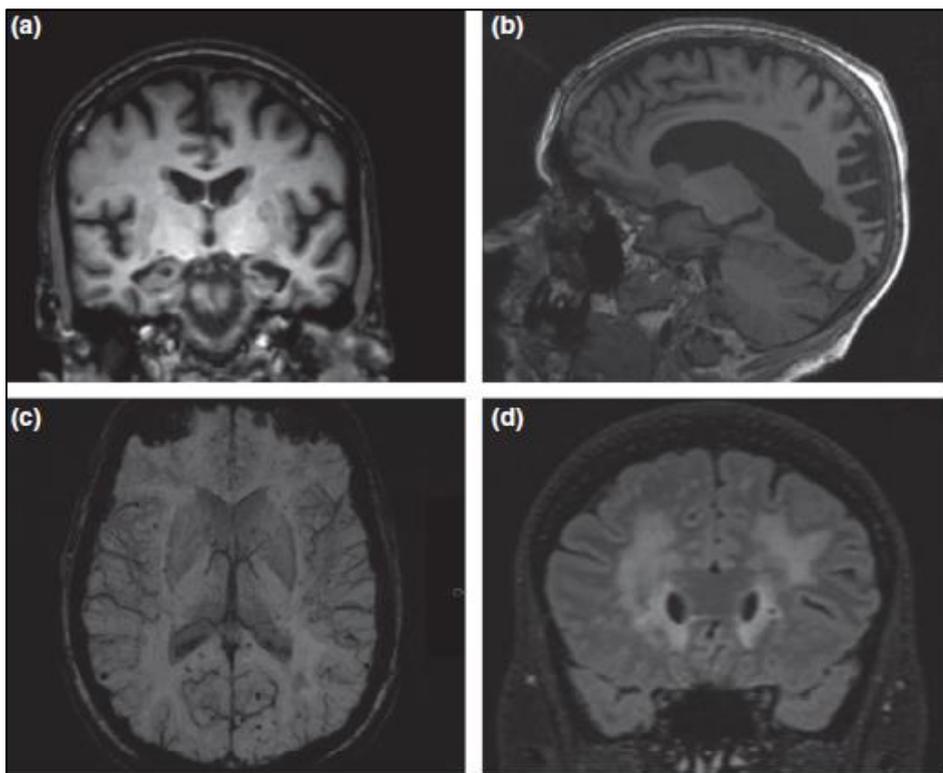


Figura 1. Immagini di risonanza magnetica che mostrano: (a) la caratteristica atrofia dell'ippocampo in un caso tipico di malattia di Alzheimer; (b) atrofia parieto-occipitale in un caso di atrofia corticale posteriore, qui dimostrata sul piano sagittale in T1; (c) microemorragie che sono meglio visualizzate in SWI (la distribuzione posteriore vista su questa immagine assiale è caratteristica dell'angiopatia amiloide cerebrale); (d) estese iperintensità della sostanza bianca periventricolare e sottocorticale, meglio visualizzate con la FLAIR, qui osservate su un'immagine coronale. Lane et al. 2018.

1.3 Eziologia

Pur non essendo stata riconosciuta alcuna eziologia specifica, molti possibili fattori di rischio sono stati associati all'AD. Nello specifico, diversi studi fanno riferimento a fattori quali:

- **Fattori genetici:** escludendo le forme ereditarie (5-10% dei casi), diversi fattori genetici rivestono un ruolo nella patogenesi di alcune forme AD. Il primo gene identificato è stato il gene codificante per il precursore proteico dell'amiloide sul cromosoma 21. Mutazioni puntiformi del gene APP inducono una forma di malattia di AD familiare con trasmissione autosomica dominante ed età d'esordio precoce. Difatti, i soggetti adulti con trisomia 21 - sindrome di Down - che sopravvivono dopo i 40 anni sviluppano una progressiva demenza che si sovrappone al ritardo mentale di base e che è accompagnata da reperti anatomo-patologici tipici della malattia di Alzheimer (Fortea et al., 2020). Probabilmente, la presenza di un gene APP sul cromosoma 21 soprannumerario rappresenta la causa della demenza nei soggetti con sindrome di Down e può determinare la formazione di un eccesso di proteina amiloide nell'encefalo.

Studi su ampi gruppi familiari con malattia di Alzheimer multigenerazionale hanno consentito di identificare altri due geni coinvolti nella patogenesi della malattia, chiamati *presenilini* (Perkovic & Pivac, 2019). La mutazione dei geni presenilini è raramente coinvolta nei comuni casi sporadici di malattia di Alzheimer a insorgenza tardiva nella popolazione generale. Attualmente è possibile in alcuni centri di ricerca eseguire un'indagine genetica volta a individuare queste rare mutazioni. Per l'AD ad esordio tardivo, l'unico fattore noto di rischio genetico è l'allele e4 del gene APOE, localizzato sul cromosoma 19, evidenziato per la prima volta nel 1993 (Rebeck et al., 1993). Anche se l'allele APOEe4 è stato correlato ad elevato rischio per lo sviluppo di AD, esso è evidenziabile solo nel 50% dei casi. Ciò suggerisce l'ipotesi che altri geni, oltre l'APOE, giochino un ruolo nella patogenesi dell'AD. Questi dati discordanti suggeriscono

dunque l'importanza dei fattori ambientali, supportando l'ipotesi patogenetica multifattoriale per l'AD.

- **Età e sesso:** l'età è il principale fattore di rischio per l'AD, ponendo il difficile problema di differenziare aspetti neuropsicologici e neuropatologici di invecchiamento fisiologico da quelli osservati in presenza di tale patologia. Il sesso sembra anche essere un fattore di rischio. Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato un'incidenza di AD più elevata nelle donne rispetto agli uomini, ma solo dopo gli 85 anni di età. Ciò potrebbe essere spiegato da un effetto protettivo degli estrogeni in epoca pre-menopausale (Sheyer et al., 2018).
- **Attività fisica:** studi di coorte hanno evidenziato un'associazione positiva tra attività fisica e funzioni cognitive nella popolazione anziana, con una riduzione associata del rischio di decadimento cognitivo del 30-50% (Rabaglietti et al., 2011).
- **Farmaci:** diversi studi hanno evidenziato un'associazione tra terapia ormonale sostitutiva e riduzione del rischio di AD (Shao et al., 2012). Questa evidenza sarebbe coerente con i dati epidemiologici che mostrano una certa protezione legata al sesso. È stato anche dimostrato un effetto positivo dei FANS nel ridurre il rischio AD. Ancorché dibattuto, questo dato potrebbe trovare una sua spiegazione nell'ambito di aspetti fisiopatologici legati all'infiammazione.
- **Istruzione:** vi sono diverse evidenze di una significativa associazione tra livello di istruzione e livello di funzionamento cognitivo. Le persone con un livello di scolarità più alto potrebbero beneficiare di una riserva cognitiva più rilevante che potrebbe, a sua volta, ritardare l'insorgenza delle manifestazioni cliniche della demenza. Da qui il concetto di *riserva cognitiva* secondo il quale esperienze di vita, come l'educazione scolastica e lo svolgimento di attività di una certa complessità, possono fornire ad alcune persona una "riserva", che consentirebbe loro di sopportare e di rispondere meglio alla progressione della malattia dementigena.
- **Consumo di alcool:** l'assunzione moderata di bevande alcoliche sembrerebbe proteggere le persone anziane dall'AD. L'effetto positivo dell'assunzione di alcool

non sembrerebbe verificarsi invece nei pazienti con MCI o in soggetti portatori di allele APOE. Al contrario, in questi soggetti un consumo eccessivo di bevande alcoliche potrebbe associarsi ad un aumentato rischio di malattia.

- **Indice di massa corporea:** sovrappeso e obesità sono fattori di rischio per l'AD. Vi è un'associazione inversa tra IMC e rischio di sviluppare demenza in soggetti con età superiore ai 65 anni (Burns et al., 2010). È stato inoltre dimostrato un aumento del rischio di AD in soggetti obesi (IMC>30) con età intorno ai 50 anni.
- **Comorbidità:** un rischio aumentato di AD si associa a svariate patologie. Il diabete mellito di tipo 2 ha come meccanismo principale quello dell'insulino-resistenza, che a sua volta si associa a meccanismi di formazione di β -amiloide e alla presenza di agenti infiammatori a livello cerebrale. È stato dimostrato, inoltre, che storie di trauma cranico o di depressione sono da includere tra i fattori di rischio per l'AD (Lenzo et al., 2018).
- **Fattori ambientali:** in tale ambito rientrerebbero fattori quali l'esposizione all'alluminio, eccessiva assunzione di acidi grassi polinsaturi, anche se i dati al riguardo sono ancora largamente controversi.

1.4 Sintomi Cognitivi e Sintomi Comportamentali dell'AD

I sintomi che si manifestano nel corso dell'AD possono essere raggruppati in due clusters: Sintomi Cognitivi e Sintomi comportamentali e Psicologici.

Come noto, la funzione più frequentemente alterata nell'AD è la memoria: nello specifico, il deficit della memoria per i fatti recenti è la caratteristica clinica preminente della malattia di cui costituisce l'esordio clinico. La memoria autobiografica e quella relativa ai fatti storici, non recenti e a lungo termine, risultano inalterate.

Il disorientamento (spaziale e temporale) si manifesta costantemente nel corso della malattia. All'inizio il problema può limitarsi alla difficoltà nell'indicare una data, ma con l'aggravarsi della malattia il paziente perde la capacità di collocare se stesso e gli

eventi che vive nel tempo e nello spazio: questo porta spesso il paziente a smarrirsi fuori casa aumentando il rischio di fuga e di vagabondaggio.

I deficit della concentrazione e dell'attenzione sono tra i sintomi più precoci e anche la compromissione del linguaggio è frequente nel corso dell'AD (Ahmed et al., 2013): inizialmente la funzione linguistica sembra essere preservata, ma a lungo andare si riscontra un impoverimento del vocabolario, come dimostrato dalle difficoltà nel reperimento dei vocaboli oltre che dalla comparsa di anomie. Possono evidenziarsi inoltre parafasie (fonemiche e semantiche), mentre una sindrome afasica più complessa con deficit della denominazione, della ripetizione e della comprensione si presenta in genere tardivamente.

Tra le agnosie, l'anosognosia è molto comune nell'AD e la non consapevolezza di malattia complica la gestione del malato (Starkstein, 2014).

Le aprassie sono funzionalmente legate al deficit visuo-spaziale. L'aprassia costruttiva, in particolare, può essere valutata impiegando prove che indagano la capacità di costruzione, composizione e disegno. Il disegno dei pazienti AD presenta generalmente semplificazioni, distorsioni e mancanza di prospettiva e, negli stadi più avanzati, può manifestarsi la tendenza a sovrapporre in maniera parziale o totale la copia sul modello (evento definito *closing-in*). Si noti, infine, che i disturbi esecutivi e le alterazioni del pensiero astratto, che in alcuni casi risultano presenti già all'esordio dei sintomi, compromettono la capacità di pianificazione, critica e di giudizio con l'avanzare della malattia (Roy et al., 2008).

Sintomi comportamentali e psicologici dell'AD

Un aspetto clinico rilevante nell'AD è la presenza, variabile ma comunemente riscontrabile nel corso della malattia, di disturbi comportamentali e sintomi psichici che si manifestano con una vasta gamma fenomenologica. Oltre il 70% dei pazienti presentano sintomi "non cognitivi" quali depressione, ansia, apatia, deliri, allucinazioni,

agitazione, aggressività (verbale e/o fisica), irritabilità, comportamenti sociali inappropriati, disinibizione, euforia, disturbi del sonno e della condotta alimentare (Mazzarini et al., 2004).

L'insorgenza di questi sintomi è la causa più frequente di intervento medico e di prescrizione farmacologica. L'uso di scale dedicate come la *Neuropsychiatric Inventory* (NPI) può essere utile per stimare la gravità e la frequenza di questi sintomi e l'eventuale risposta alla terapia effettuata.

Nelle fasi avanzate di malattia il deterioramento cognitivo è così severo che il paziente non è più in grado di svolgere da solo anche le attività basilari della vita quotidiana come vestirsi, lavarsi, provvedere alle proprie necessità fisiologiche. Ne consegue che il sovrapporsi di tutte queste condizioni riduce notevolmente l'aspettativa e la qualità della vita del soggetto.

1.5 Strumenti diagnostici

La diagnosi di demenza è prevalentemente una diagnosi clinica. I criteri più utilizzati per la diagnosi AD sono quelli proposti nel 1984 dal NINCDS-ADRDA e quelli del DSM IV. Il *gold standard* della diagnosi di AD si basa sul riscontro post mortem delle alterazioni neuropatologiche tipiche nel cervello del soggetto affetto. La presenza e la distribuzione delle placche amiloidee e dei grovigli neurofibrillari permettono di formulare la diagnosi certa di malattia e di stabilirne lo stadio evolutivo. In vita, la diagnosi si basa sulla raccolta accurata delle informazioni anamnestiche, sull'esame neurologico e fisico generale, sulle neuroimmagini come TC e RMN dell'encefalo (Porsteinsson et al., 2021).

Per completare l'iter diagnostico vengono considerati esami di laboratorio di routine, il dosaggio degli ormoni tiroidei, il dosaggio di alcuni fattori ematici, come la vitamina B12 e l'acido folico (Chen et al., 2016).

Per un'anamnesi mirata deve essere attentamente valutata la presenza di patologie internistiche, che possono secondariamente spiegare l'insorgenza di decadimento cognitivo: iper- o ipotiroidismo, diabete mellito e ipertensione arteriosa. Inoltre, deve essere esclusa la presenza di patologie psichiatriche, di pregressi traumi cranici e di altre malattie neurologiche. Particolare attenzione va anche posta ai farmaci assunti dal paziente in quanto molti di essi, specie nell'anziano, possono aggravare la demenza. Infinite è molto importante indagare l'eventuale presenza di demenze in altri membri della famiglia.

La valutazione delle funzioni cognitive rappresenta il momento centrale della fase diagnostica. La somministrazione di test da parte di neuropsicologi qualificate in strutture ad alta specializzazione, come i Centri per i Disturbi Cognitivi e Demenze (CDCD), permette di ottenere un profilo neuropsicologico accurato del paziente e di descrivere, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, i deficit presenti. Un approccio di questo tipo garantisce un'accuratezza diagnostica del 70-90% rispetto alla diagnosi istopatologica. La batteria di test impiegata deve indagare tutte le funzioni cognitive. Questa, associata all'uso di test di veloce somministrazione come il MMSE, il *Montreal Cognitive Assessment* (MoCa) e la *Clinical Dementia Rating Scale* (CDR), fornisce gli strumenti necessari per l'inquadramento diagnostico e il *follow-up* del deficit. In particolare, la valutazione neuropsicologica è indispensabile soprattutto nelle fasi iniziali di decadimento cognitivo, quando il confine tra invecchiamento normale e patologico è incerto.

Importante per la diagnosi AD è anche la valutazione comportamentale-psicologica: i sintomi comportamentali sono di solito identificati sulla base dell'osservazione del paziente, mentre i sintomi psicologici sono identificati sulla base dell'intervista al paziente ed ai familiari. La valutazione comportamentale viene effettuata mediante l'uso di scale specifiche che permettono di quantificare la frequenza e la gravità dei disturbi più comunemente osservati. Tra le principali scale, si menzionano:

1. *Neuropsychiatric Inventory (NPI)*
2. *Behavioral Pathological Rating Scale*
3. *Behavioral Scale del Consortium to Establish a Registry in AD (CERAD).*
4. *Scala di Hamilton e Back inventory*, per valutare la depressione.

L'impiego di neuroimmagini standard dell'encefalo consente, in primis, di escludere altre cause del deterioramento cognitivo (lesioni occupanti spazio, lesioni vascolari, ecc.). Un esame di neuroimaging cerebrale "anatomico" (TAC, RM) è da considerarsi mandatorio al momento della prima diagnosi. Gli esami di neuroimaging cerebrale "funzionale", quali la SPECT e la PET, che forniscono indicazioni metaboliche cerebrali, sono indicati in casi di demenza a presentazione atipico o ad evoluzione atipica (Zhu et al., 2014). Tecniche di acquisizioni più complesse, come la RMN volumetrica ad alta risoluzione consentono invece di valutare il pattern di atrofia regionale presente nel paziente.

L'esame del liquido cefalorichidiano viene anch'esso impiegato nella diagnosi in vita dell'AD. Oltre all'analisi cito-fisica e chito-chimica, esso consente di dosare la concentrazione delle diverse specie di amiloide e *tau* nel liquor.

I *biomarkers* indentificati nel liquido cerebrospinale e nel sangue dei pazienti AD includono la β -amiloide ($A\beta$ 40 e $A\beta$ 42), la Tau totale (T-Tau) e la Tau fosforilata (P-tau). Nello specifico, P- Tau e T-Tau sono possibili indicatori prognostici circa la gravità della malattia. Bassi livelli di $A\beta$ 42 possono indicare un maggiore rischio di morte precoce e la combinazione di $A\beta$ 42 e Tau nel liquido cerebrospinale ha mostrato una buona accuratezza predittiva nella diagnosi di AD (Boss, 2000).

1.6 Trattamenti terapeutici standard

Nonostante gli enormi sforzi in ambito scientifico, ad oggi non sono disponibili terapie farmacologiche efficaci per l'AD, che resta una patologia incurabile. I trattamenti vigenti prevedono l'uso di farmaci cosiddetti "sintomatici": questi hanno lo scopo di agire su alcuni sintomi del declino cognitivo senza intervenire, però, sui meccanismi patogenetici alla base. Tra questi tentativi, gli approcci farmacologici attualmente disponibili per l'AD mirano a correggere il deficit colinergico. I farmaci anticolinesterasici, bloccando l'enzima che degrada l'acetilcolina a livello delle sinapsi nervose, ne aumentano la biodisponibilità e suppliscono alla perdita di neuroni colinergici.

Tra le tecniche di attivazione specifica, d'altro canto, rientrano tutte quelle tecniche di riabilitazione derivanti dalla ricerca sul funzionamento dei processi cognitivi, le quali si basano sull'idea di sfruttare le capacità cognitive residue al fine di minimizzare l'effetto del deficit. Ad esempio, nell'AD in fase iniziale, il deficit cognitivo è soprattutto a carico del magazzino di memoria dichiarativa episodica, mentre altri aspetti della memoria risultano compromessi in fasi più avanzate (Kirova et al., 2015).

Tra gli anticolinesterasici più utilizzati vi sono il Donezepil, la Rivastigmina e la Galantamina: tutte trovano indicazione nelle fasi lieve e moderata della malattia. Nello specifico, la Rivastigmina agisce inibendo anche un secondo enzima che catabolizza l'acetilcolina a livello delle regioni sottocorticali: la butirrilcolinesterasi. La Galantamina, oltre all'effetto inibitorio sull'enzima acetilcolinesterasi, è in grado di modulare i recettori nicotinici presenti sui neuroni colinergici favorendone il rilascio del neurotrasmettitore. Tali farmaci hanno dato risultati soddisfacenti sia da un punto di vista della tollerabilità (scarsi effetti collaterali) che dal punto di vista dell'efficacia.

L'uso degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) consente di migliorare l'ansia e l'irrequietezza nelle fasi iniziali ed intermedie di malattie anche in

assenza di depressione, e di ridurre l'agitazione nei casi più avanzati (Bartels et al., 2018).

In media, i farmaci anticolinesterasici sono efficaci nel migliorare, anche se per periodi brevi di tempo, i deficit cognitivi dell'AD. Inoltre, secondo alcuni autori, essi svolgerebbero anche un'azione neuroprotettiva, intervenendo sulla cascata amiloidogena.

Un approccio alternativo si basa su molecole, come la memantina, in grado di ridurre l'effetto citotossico dell'acido glutammico (McSchane et al., 2019). Vi sono inoltre altre terapie in fase di sperimentazione, mirate a modificare i processi fisiopatologici dell'AD. La memantina viene impiegata per il trattamento delle fasi moderate e severe della malattia ed agisce come inibitore competitivo dei recettori glutamatergici NMDA. L'effetto di questa inibizione determina la modulazione dell'attività del glutammato sui recettori che fisiologicamente regolano l'entrata del calcio nella cellula favorendo i fenomeni di potenziamento sinaptico a breve e a lungo termine (*long e short term synaptic potentiation*) alla base dei processi di apprendimento e di memoria.

A complemento della terapia farmacologica e a seguito di evidenze che la mancanza di una costante stimolazione cognitiva durante la vita riduca la riserva cognitiva e favorisca il deterioramento, hanno spinto la ricerca a indagare gli effetti di interventi non farmacologici anche nell'AD. I principi su cui si basano i diversi interventi sono estremamente vari, come i target che si propongono: aumento delle performances cognitive, controllo dei sintomi comportamentali e psicologici della demenza, miglioramento della qualità della vita dei pazienti. Esistono strategie riabilitative e comportamentali come la tecnica di attivazione cognitiva aspecifica che vengono utilizzate per stimolare capacità residue e migliorare l'esecuzione di compiti quotidiani. Tra gli interventi con focus prevalentemente cognitivo, la stimolazione cognitiva è tra le più utilizzate: essa consiste in una vasta gamma di attività strutturate,

finalizzate al miglioramento generale del funzionamento sociale e al mantenimento di diverse funzioni. Si tratta di un approccio che pone particolare enfasi sulle interazioni sociali e che viene generalmente attuato sotto forma di attività di gruppo. La riabilitazione cognitiva è focalizzata sull'identificazione di obiettivi da raggiungere rispetto ai deficit presentati dall'individuo. Questi vengono trattati proponendo un approccio di tipo compensatorio, in cui una funzione preservata diventa vicariante rispetto a quella deficitaria.

Come detto, la maggior parte delle sperimentazioni effettuate sinora non ha dimostrato l'efficacia di terapie farmacologiche, e uno dei motivi sembra essere la scelta del campione incluso, costituito da pazienti con un deterioramento cognitivo già evidente. Difatti, come suggerito in letteratura, la terapia con anticorpi monoclonali o con inibitori della β -secretasi dovrebbe essere somministrata nelle fasi iniziali della malattia per essere realmente efficace, dunque prima che i meccanismi patogenetici abbiano già causato un danno irreversibile. Con tali conclusioni, appare sempre più evidente l'importanza di una diagnosi AD precoce e tempestiva ai fini di preservare la qualità di vita del paziente.

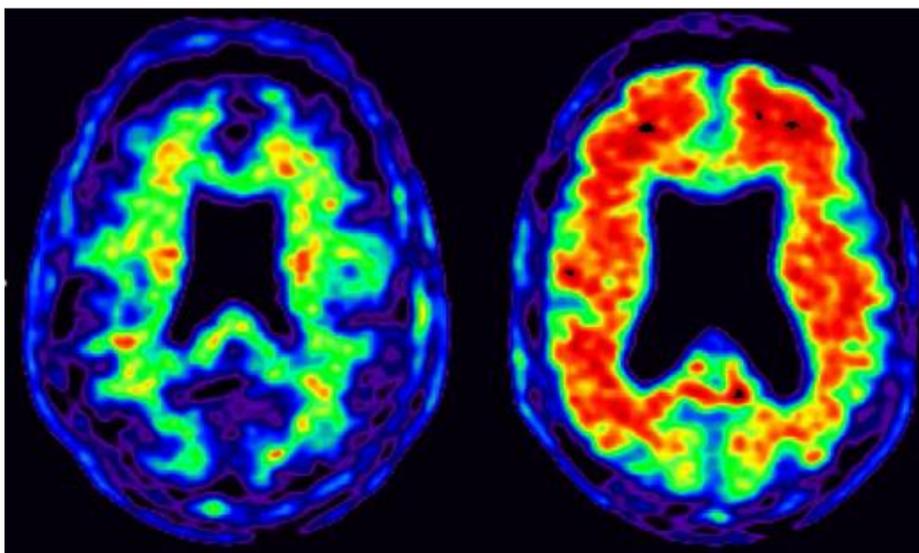


Figura 2: Tomografia a emissione di positroni in un controllo sano (a sinistra) e un paziente con malattia di Alzheimer (a destra). I colori caldi indicano un elevato accumulo di amiloide. Lane et al, 2018.

2. SISTEMA SPECCHIO: DALLE ORIGINI ALL'UOMO

L'uomo è un animale sociale la cui vita è strettamente legata alla capacità di capire cosa fanno gli altri, comprendendone le intenzioni e interpretandone le azioni. I meccanismi alla base di queste facoltà cognitive sociali erano fino a non molti anni fa poco conosciuti. La scoperta dei neuroni specchio nella scimmia e la successiva dimostrazione dell'esistenza di un sistema specchio anche nel cervello umano hanno messo in evidenza per la prima volta un meccanismo neurofisiologico capace di spiegare molti aspetti della capacità dell'uomo di relazionarsi con gli altri (Rizzolatti, G., Fogassi, L., & Gallese, V. *Specchio, neuroni*).

2.1 Scoperta dei neuroni specchio

All'inizio degli anni Novanta del 20° secolo, un gruppo di ricercatori dell'Università di Parma, coordinato da Giacomo Rizzolatti e composto da Luciano Fadiga, Leonardo Fogassi, Vittorio Gallese e Giuseppe Di Pellegrino, scoprì e descrisse una classe di neuroni presenti nella corteccia cerebrale premotoria di macaco (*Macaca mulatta*) che si attivavano sia quando l'animale eseguiva semplici atti motori finalizzati, come afferrare un pezzo di cibo, sia quando vedeva un altro individuo - uomo o scimmia - eseguire lo stesso atto motorio (Di Pellegrino et al. 1992; Gallese et al. 1996; Rizzolatti et al. 1996).

Nello specifico, durante una serie di studi volti a indagare, mediante registrazione di singoli neuroni, le proprietà di un'area della corteccia motoria (area F5) del cervello del macaco coinvolta nell'esecuzione di atti motori finalizzati della mano e della bocca, si osservò che quando uno sperimentatore afferrava del cibo, i neuroni della scimmia si attivavano esattamente come se fosse stata lei stessa ad afferrarlo: da qui la nota e importante scoperta dei *neuroni specchio*, destinata a diventare una delle più rilevanti per le Neuroscienze Cognitive e per la Psicologia.

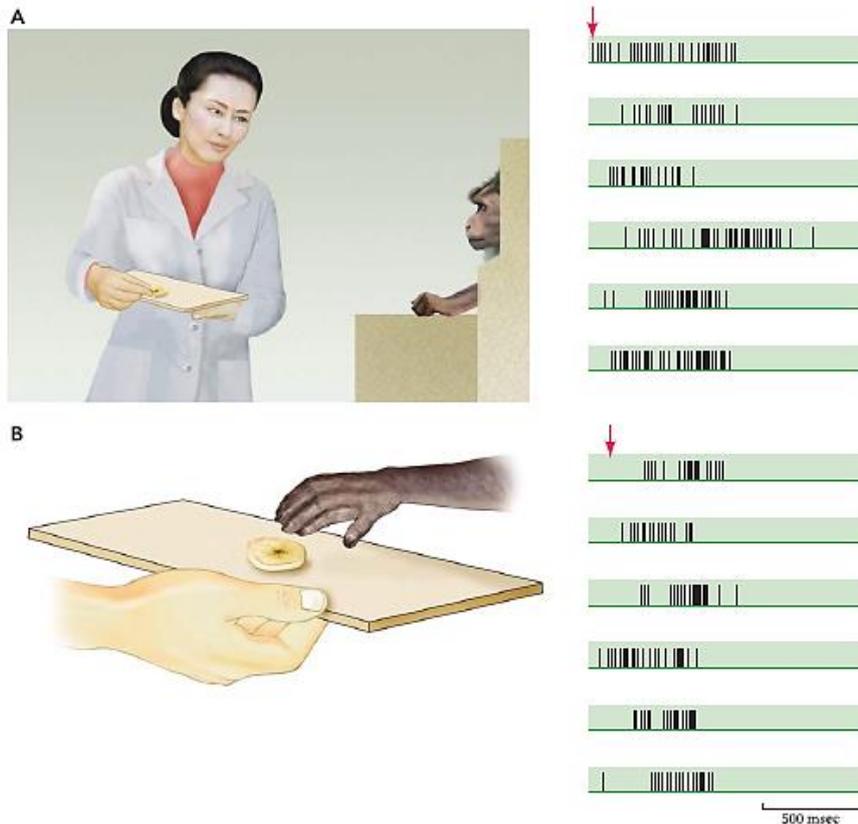


Figura 3: Esempio di un neurone specchio F5: le scariche neuronali durante l'osservazione di un movimento di presa fatto dallo sperimentatore (A) e durante i movimenti di presa della scimmia (B). Fonte: Fabbri-Destro & Rizzolatti, 2008.

Per quel che concerne le proprietà dei neuroni specchio, tali cellule non rispondono alla semplice presentazione del cibo o di altri oggetti che pure interessano l'animale, né si attivano all'osservazione di un'azione mimata senza la presenza dell'oggetto. Affinché il neurone specchio si attivi è necessaria l'effettiva interazione della mano con un oggetto bersaglio dell'azione (Rizzolatti & Craighero, 2004).

Sulla base delle loro proprietà motorie, i neuroni specchio sono stati suddivisi in varie classi: tra queste, le più comuni sono quelle dei neuroni dell'afferrare, del manipolare, dello strappare, del tenere. I neuroni specchio non si attivano soltanto durante movimenti eseguiti con la mano: vi sono, infatti, neuroni specchio che "sparano" anche quando la scimmia compie o osserva atti motori eseguiti con la bocca (Rizzolatti & Fabbri-Destro, 2008).

Dopo la scoperta dei neuroni specchio nella corteccia premotoria, altri studi hanno dimostrato la loro presenza nel lobo parietale inferiore, in particolare nelle aree PFG e AIP. Queste aree ricevono informazioni visive dalla corteccia del solco temporale superiore (STS) e sono riccamente connesse alla corteccia premotoria.

La caratteristica distintiva dei neuroni specchio parietali e premotori è la stretta relazione che mostrano tra gli atti motori che codificano e tra gli atti visivi motori a cui rispondono. Utilizzando come criterio di classificazione la congruenza tra gli atti motori eseguiti e quelli osservati efficaci nell'innescarli, i neuroni specchio sono stati suddivisi in due classi principali: neuroni specchio *strettamente congruenti* e neuroni specchio *ampiamente congruenti* (Gallese et al., 1996). I neuroni specchio strettamente congruenti si attivano quando gli atti motori effettivi osservati ed eseguiti sono identici sia in termini di obiettivo (ad esempio, afferrare), sia in termini di modalità di raggiungimento di tale obiettivo (ad esempio, presa di precisione), mentre i neuroni specchio ampiamente congruenti richiedono, per essere attivati, la somiglianza, ma non l'identità, tra gli atti motori effettivi osservati ed eseguiti. Per confermare tali ipotesi, sono state condotte due serie di esperimenti. Nel primo, gli autori hanno verificato se i neuroni specchio fossero in grado di riconoscere le azioni dai loro suoni. Si è scoperto che molti neuroni specchio che rispondevano all'osservazione visiva di attori motori accompagnati da suoni rispondevano anche al solo suono, e da qui furono chiamati "neuroni audio-visivi" (Rizzolatti & Fadiga, 2008).

In un'altra serie di esperimenti (Umiltà et al., 2001) la scimmia vedeva la mano dello sperimentatore che afferrava e teneva un oggetto (condizione di "visione completa"); nell'altra, la scimmia vedeva solo la mano dello sperimentatore che si muoveva verso uno schermo, ma non la parte critica finale dell'atto motorio, cioè l'interazione mano-oggetto (condizione "nascosta"). I risultati hanno mostrato che più della metà dei neuroni specchio F5 scaricava nella condizione nascosta. Questo dimostra che quando la scimmia ha indizi sufficienti per creare una rappresentazione mentale dell'atto

motorio osservato, i neuroni specchio lo descrivono anche se l'atto motorio non è visibile.

Nel complesso, questi esperimenti sostengono fortemente l'idea che l'attività del Sistema Specchio sia alla base della comprensione degli atti motori.

È importante specificare che tale comprensione avvenga in modo diretto: è come se le intenzioni degli altri appartenessero anche agli altri che le osservano perché "simulate" internamente, mediante un'attivazione di circuiti che è condivisa. Tale accezione ha portato all'origine della nota teoria della "simulazione incarnata", o embodied cognition, intesa come il grado zero dell'intersoggettività (Gallese, 2007).

2.2 Il sistema specchio nell'uomo: un sistema per la codifica delle intenzioni

La scoperta dei neuroni specchio è avvenuta inizialmente analizzando il cervello del macaco, ma ci è voluto poco per capire che questo sistema fosse presente anche nell'uomo: difatti, la capacità di capire le azioni degli altri nell'essere umano è talmente rilevante che non poteva essersi persa nella filogenesi e ciò andava dimostrato.

Come detto precedentemente, l'essenza del meccanismo dei neuroni specchio è la trasformazione di specifiche informazioni sensoriali in un formato motorio: questo sistema può essere dimostrato nell'uomo attraverso diverse tecniche di neuroimaging, come la stimolazione magnetica transcranica (TMS), l'EEG, la MEG e le tecniche di imaging cerebrale (PET, fMRI).

Le funzioni mediate dal Sistema Specchio variano a seconda della sua collocazione nelle aree cerebrali. Tra le reti dotate di un meccanismo specchio, la più studiata è quella del lobulo parietale inferiore e dalla corteccia premotoria ventrale. Questa rete, difatti, trasforma le rappresentazioni sensoriali di atti motori osservati o ascoltati in rappresentazioni motorie degli stessi atti. Nello specifico, come dimostrato da molti studi di imaging cerebrale, i due nodi principali del sistema specchio sono il

lobulo parietale inferiore (IPL) e la corteccia premotoria ventrale (PMv), più la parte caudale del giro frontale inferiore (IFG) (Rizzolatti & Fadiga, 2008).

Un sistema specchio è stato dimostrato anche nell'insula e nel cingolo rostrale: questo meccanismo trasformerebbe le situazioni emotive osservate in risposte visceromotorie analoghe a quelle presenti quando un individuo sperimenta realmente quelle emozioni, anche se è bene specificare che non è ancora possibile parlare di "neuroni specchio per le emozioni", data l'enorme complessità di studiare i singoli neuroni nell'uomo. Mettendo insieme i risultati derivanti da diversi studi, è possibile strutturare una "mappa" delle attivazioni del cervello umano.

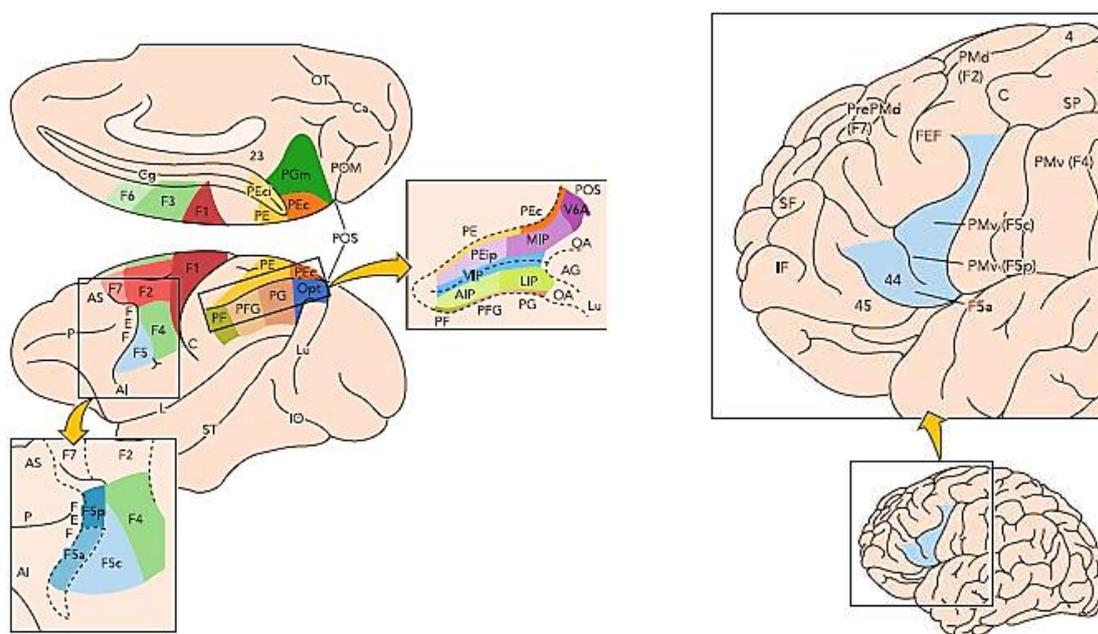


Figura 4: A sinistra: Viste mesiali e laterali del cervello di macaco

La parte centrale della figura mostra la parcellazione citoarchitettónica della corteccia motoria frontale (aree indicate con F e numeri arabi) e del lobo parietale (aree indicate con P e lettere progressive). L'ingrandimento della regione frontale mostra la parcellazione di F5. Il rettangolo a destra mostra le aree sepolte nel solco intraparietale. AIP, area intraparietale anteriore; IP, solco intraparietale; LIP, area intraparietale laterale; IP, are intraparietale mediale; Pos, solco parieto-occipiale, AS, solco arcuato superiore; AI, solco arcuato inferiore, C, solco centrale; Ca, fessura calcarina; CG, corteccia cingolata; FEF, campo visivo frontale; L, solco laterale; Lu, solco lunare; P, solco principale; STS, solco temporale superiore.

A destra: Vista laterale della corteccia umana con un ingrandimento del lobo frontale

Suddivisione citoarchitettónica secondo Brodmann. Le aree in giallo mostrano le aree che rispondono all'osservazione e all'esecuzione di atti motori della mano. In alto: vista ingrandita del lobo frontale. Sono indicate le possibili omologie tra la corteccia premotoria della scimmia e quella umana. C, solco centrale; IF, solco frontale inferiore; FED, campo visivo frontale; Pmd, corteccia premotoria dorsale; PMv, corteccia

premotoria dorsale; PMv, corteccia premotoria ventrale; PrePmd, corteccia premotoria dorsale; SP, parte superiore del solco precentrale superiore. Rizzolatti et al 2008.

Tra queste, sono presenti:

1. corteccia premotoria ventrale (PMV) , omologa dell'area F4 e F5 comprendendo sia i campi brachio-manuali, sia i campi buccali;
2. il giro frontale inferiore (IFG);
3. corteccia prefrontale posteriore inferiore, che comprende l'area 44 e parte dell'area 45, ed è l'omologa di una parte dell'area F5 della scimmia;
4. lobulo parietale inferiore, con parte del giro marginale e parte di quello angolare;
5. solco intraparietale;
6. lobo parietale superiore;
7. corteccia premotoria dorsale

Come possibile notare, è presente un grande coinvolgimento della corteccia premotoria e della corteccia parietale, che sono connesse da circuiti parieto-premotori, e questo esito conferirebbe che il Sistema Specchio è difatto derivato dal sistema motorio: tramite un input, visivo o acustico, si accede alle rappresentazioni motorie contenute. Questo ha fatto che si che il sistema motorio assumesse un importante ruolo nella cognizione, in quanto da sempre ritenuto un sistema a parte, specifico per il movimento. A tal riguardo, una funzione rilevante del Sistema Specchio è quella di dare una comprensione immediata, non mediata cognitivamente, del comportamento motorio osservato: ciò ha aperto le porte ad una nuova visione della comprensione delle intenzioni o azioni altrui, ben diversa dalla nota Teoria Della Mente (ToM), secondo la quale la comprensione degli stati mentali degli altri avverrebbe a seguito di

un percorso ben preciso nello sviluppo e, soprattutto, mediante un ragionamento da parte dell'individuo, attraverso l'introspezione, e attraverso la congettura che gli altri, avendo atteggiamenti e comportamenti simili ai propri, abbiano anche stati mentali propri (Gallese, 2007).

Uno dei primi esperimenti volto ad indagare il mondo delle intenzioni in ambito neuroscientifico, inteso come aspettativa che fa riferimento alla volontà della persona, è quello condotto da Libet nel 1985 (Libet, 1985), il quale dimostra che circa 500 ml secondi prima dell'inizio del movimento volontario inizia l'attività elettroencefalografica a livello della corteccia supplementare, mentre la consapevolezza di quest'ultimo avverrebbe solo 200 ml secondi prima. I risultati dimostrerebbero, dunque, che l'attività nervosa inizi prima che il soggetto ne abbia consapevolezza.

L'azione, nello specifico, è da intendersi come un aspetto intenzionale: l'uomo agisce per raggiungere un obiettivo. A tal riguardo, grazie ad uno studio diretto da Fogassi et al. nel 2005, e poi da Bonini et al. nel 2010, sono stati scoperti nel cervello del macaco dei neuroni nell'area PFG e in F5 che riflettono l'intenzione dell'agente, in quanto modulati dallo scopo finale dell'azione: difatti, sono state scoperte popolazioni di neuroni che "preferiscono" l'afferramento per l'azione *mangiare* piuttosto che l'afferramento per *piazzare* in entrambe le aree, anche se con percentuali diverse: circa il 55% in PFG e circa il 40% in F5, ed è stata esclusa la possibile influenza della cinematica del braccio nella risposta ottenuta (Fogassi et al. 2005; Bonini et al., 2010).

In uno studio fMRI del gruppo di Iacoboni è stato possibile dedurre che la decodifica automatica dell'intenzione avvenga in un'area che fa parte del Sistema Specchio, nel suo nodo frontale. Difatti, l'esperimento in questione prevede tre situazioni: una fa riferimento al contesto, in cui vengono mostrate immagini di una scena di colazione pronta e l'altra di una colazione terminata; l'altra condizione è l'azione, in cui in un contesto neutro una mano prende un oggetto con prensioni di tipo differente; e la terza corrisponde all'intenzione, in cui vengono fuse le due situazioni, in quanto sono

presenti sia le due diverse scene, sia la dinamicità di una mano che prende una tazza con prensione diversa (Iacoboni et al., 2005).

I partecipanti dell'esperimento erano stati suddivisi in due gruppi: ad uno veniva chiesto di porre semplicemente attenzione alle tre situazioni, mentre il secondo gruppo veniva invitato a riportare esplicitamente l'intenzione dell'azione prodotta dalla mano del soggetto, così da distinguere un'intenzione diretta e automatica, da un'intenzione ragionata.

I risultati hanno riportato che nella condizione "intenzione - condizione azione" vi è un'attivazione delle aree nel giro frontale inferiore di destra, mentre nella seconda sottrazione "condizione intenzione - condizione contesto" si notano attivazioni più larghe nella parte posteriore che comprende parte della corteccia parietale, parte di quella occipito-temporale e anche parte di quella premotoria.

Nell'ultima sottrazione, quella decisiva, tra condizione intenzione e somma condizione azione e contesto, vi è un'attivazione differenziale a livello della corteccia frontale inferiore di destra, e ciò ha portato a dedurre che la decodifica automatica dell'intenzione avvenga nel nodo frontale del Sistema Specchio, con particolare coinvolgimento dell'emisfero destro.

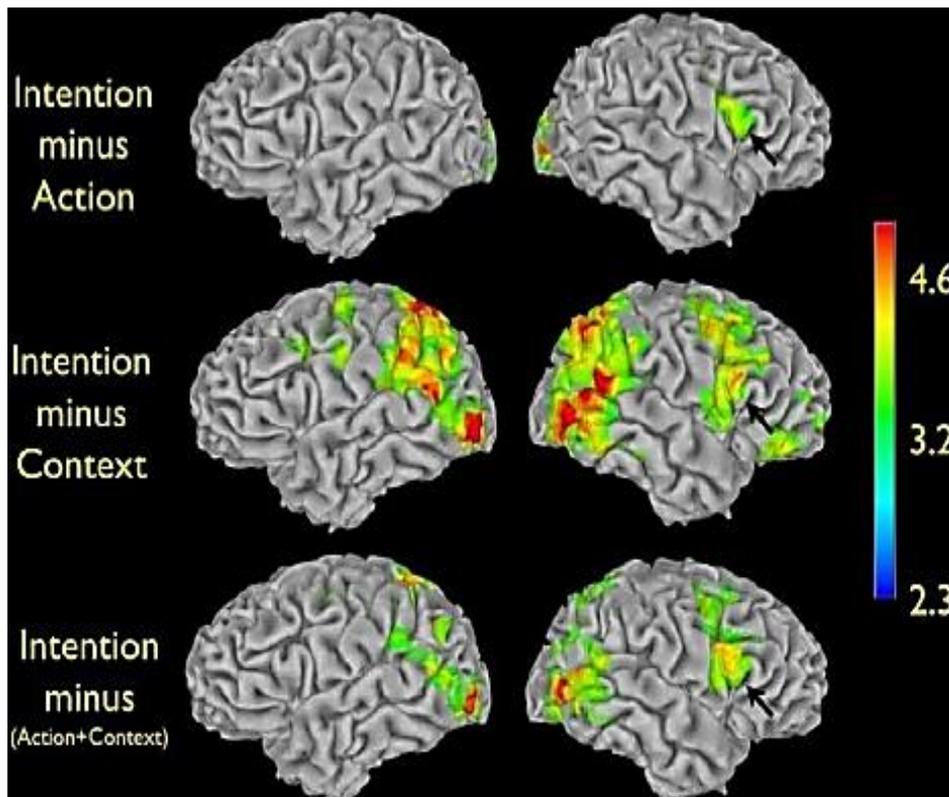


Figura 5: Attivazioni cerebrali nelle tre diverse condizioni: “intenzione - condizione azione”; “condizione intenzione - condizione contesto”; “condizione intenzione- somma condizione azione e contesto”. Iacoboni et al.2015.

Uno studio di Brass (2007) ha indagato a fondo tale aspetto: difatti, non sempre è facile per l'uomo capire i gesti e le intenzioni altrui. Da ciò nasce una distinzione tra quella che è la decodifica dell'intenzione, e dunque lo scopo finale dell'azione, e d'altra parte quella che è la ragione per cui essa viene svolta: da qui nasce un'importante distinzione tra il “come” e il “perché” che accompagnano le azioni eseguite dagli altri (Brass et al., 2007).

I soggetti dello studio, nello specifico, sono stati invitati ad osservare in risonanza alcuni videoclip di azioni svolte da un attore, distinte in “plausibili” e non “plausibili”: per maggiore chiarezza, un esempio di azione plausibile si verifica quando, avendo le mani occupate, l'attore accende l'interruttore della luce con il ginocchio, mentre è implausibile quando tale azione è svolta avendo le mani libere. Quello che è stato notato dalle attivazioni fMRI è che, dinanzi ad una situazione ambigua, vengono

attivate aree che non fanno parte dal Sistema Specchio, ma che darebbero origine al cosiddetto “circuitto della mentalizzazione”, composto dalla giunzione temporo-parietale (TPJ) e la corteccia prefrontale mediale, mentre l’attivazione del Sistema Specchio prevede l’attivazione di altre aree specifiche quali corteccia parietale inferiore, premotoria frontale e il giro frontale inferiore.

Questi risultati hanno suggerito che quando si osserva il comportamento di un altro individuo si ha un’attivazione automatica del Sistema Specchio, che avrebbe l’importante ruolo di decodificare lo scopo finale dell’azione. Nel caso in cui tali situazioni apparissero difficilmente comprensibili agli occhi degli altri, è verosimile che altre aree intervengano nella risoluzione di tale ambiguità.

Sistema Specchio e repertorio motorio

Altro dato importante che riguarda il Sistema Specchio è la sua attivazione in relazione al repertorio motorio dell’agente. Nello specifico, è stato dimostrato che l’osservazione delle azioni svolte con differenti effettori attiva, in modo somatotopico, la corteccia cerebrale nelle regioni considerate parte del Sistema Specchio.

Se si va a vedere come si attivano queste regioni quando si confronta, durante l’osservazione, esperti di una determinata specialità motoria e non esperti, è possibile evidenziare delle attivazioni differenti.

A tal riguardo, l’esperimento di Calvo-Merino (Calvo-Merino et al., 2005) è esemplificativo: lo studio in questione prevede tre gruppi di soggetti, ossia esperti di balletti classico, esperti di capoeira e di non esperti. Tutti i gruppi erano invitati separatamente a osservare dei video di danza classica o di capoeira da parte di ballerini (eguagliati rispetto agli elementi visivi di base, come lo sfondo e l’abbigliamento). Dai risultati si è visto che vi è un’attivazione delle regioni facenti parte del Sistema Specchio: nello specifico, a livello premotorio, sia ventrale che dorsale, e a livello posteriore (corteccia parietale inferiore) e alcune regioni temporali. Tali

attivazioni comprendono circuiti che, dal punto di vista degli effettori, hanno a che fare con braccia e gambe, tuttavia l'aspetto interessante riguarda il dato che gli esperti attivano la corteccia motoria di più dei non esperti quando osservano il balletto e, soprattutto, l'attivazione del giro precentrale e il solco intraparietale è diversa se confrontiamo gli esperti e i due tipi di ballo. Nello specifico, i danzatori di balletto classico hanno un'attivazione maggiore quando osservano i video che mostrano balletto classico, e viceversa per i danzatori di capoeira, che presentano l'attivazione opposta. Tali risultati dimostrano che ciascun individuo attiva di più le aree facenti parte del Sistema Specchio in relazione al tipo di abilità motoria in cui è esperto.

Uno studio successivo di Calvo-Merino ha inoltre dimostrato che tale attivazione non riguarda solo la familiarità visiva, ma anche, e soprattutto, la familiarità motoria (Calvo-Merino et al., 2006).

Un problema che è stato affrontato negli ultimi tempi è come il Sistema Specchio risponderebbe all'osservazione delle azioni della mano se l'osservatore non avesse mai avuto mani o braccia. Due persone aplasiche, nate senza braccia e mani, sono state scansionate mentre osservavano azioni manuali. I risultati hanno mostrato attivazioni nel circuito parieto-frontale mentre osservavano azioni manuali. Questo risultato dimostrerebbe che il cervello rispecchia le azioni che si discostano dalla normale organizzazione motoria, reclutando le rappresentazioni motorie coinvolte nell'esecuzione di azioni che raggiungono obiettivi corrispondenti, utilizzando effettori diversi (Rizzolatti & Fadiga, 2008).

2.3 Le basi neurali dell'imitazione e dell'apprendimento motorio

“L'esistenza di un Sistema Specchio dei movimenti intransitivi è molto rilevante per comprendere le basi neurali dell'imitazione”.
(Rizzolatti, 2008).

Il Sistema Specchio descritto finora è coinvolto nella comprensione dell'azione e dell'intenzione. Fin dall'inizio degli studi sul sistema dei neuroni specchio, tuttavia, era chiaro che negli esseri umani il sistema motorio “risuona” anche in risposta a movimenti intransitivi, compresi quelli privi di significato evidente. La prova di ciò è stata fornita soprattutto da studi TMS. Fadiga e collaboratori (1995) hanno chiesto a dei volontari di osservare uno sperimentatore che afferrava degli oggetti o eseguiva dei gesti del braccio privi di significato. Come controllo, è stato utilizzato il rilevamento dell'oscuramento di un piccolo punto di luce. I risultati hanno mostrato che l'osservazione di azioni transitive e intransitive produceva un aumento dei potenziali evocati (MEP) registrati da muscoli della mano e del braccio dell'osservatore. L'aumento è stato riscontrato nei muscoli che i partecipanti avrebbero utilizzato per produrre il movimento osservato. Questi risultati sono stati confermati da altri esperimenti in cui sono stati studiati i movimenti prossimali e distali (Fadiga et al., 1995).

L'esistenza di un sistema che si attiva in risposta a movimenti speculari intransitivi è molto importante per comprendere le basi neurali dell'imitazione. Il termine *imitazione* ha molte definizioni. Esistono tuttavia due accezioni principali in cui viene più comunemente utilizzato: la prima, definisce l'imitazione come la capacità di un individuo di replicare un atto motorio osservato; la seconda, definisce l'imitazione come la capacità di acquisire, tramite l'osservazione, un nuovo atto motorio (Rizzolatti & Fadiga, 2008).

Diversi esperimenti dimostrano che il Sistema Specchio è coinvolto nell'imitazione, intesa come replica immediata dell'atto motorio osservato. Iacoboni e collaboratori (1995) hanno testato volontari in due condizioni principali: "osservazione" e "esecuzione dell'osservazione" (Iacoboni et al., 1995). Nella condizione di osservazione, ai partecipanti veniva mostrato un dito in movimento, una croce su un dito fermo o una croce su uno sfondo vuoto. L'istruzione era di osservare lo stimolo. Nella condizione di esecuzione dell'osservazione, venivano presentati gli stessi stimoli, ma questa volta l'istruzione era di sollevare il dito destro, il più velocemente possibile, in risposta ad essi. Il contrasto cruciale tra le prove consisteva nel fatto che i volontari eseguivano il movimento in risposta a un'azione osservata (imitazione) e nel fatto che il movimento era innescato da una croce (un comportamento non imitativo). I risultati hanno mostrato un'attivazione del Sistema Specchio, e in particolare della parte posteriore dell'IFG, che risultava più forte durante l'imitazione.

Un'ulteriore prova che il Sistema Specchio gioca un ruolo fondamentale in questo tipo di imitazione è stata fornita dalla TMS ripetitiva (rTMS), una tecnica che provoca una depressione transitoria della regione stimolata. Il gruppo di Heiser (Heiser et al., 2003) ha stimolato la parte caudale del giro frontale sinistro (area di Broca) mentre premevano i tasti di una tastiera, premevano i tasti in risposta a un punto di luce rossa che indicava quale tasto premere o imitavano un movimento di pressione dei tasti fatto da un altro individuo. I dati hanno mostrato che la rTMS ha ridotto le prestazioni dei partecipanti durante l'imitazione, ma non durante gli altri due compiti.

Più complessi sembrano essere i meccanismi coinvolti nell'apprendimento per imitazione. In questo caso l'imitazione sembra essere il risultato di due processi distinti: il primo, riguarda la segmentazione dell'azione da imitare nei suoi elementi individuali, il secondo la loro trasformazione in potenziali movimenti e atti motori in uno schema temporale e spaziale che replica quello mostrato dall'attore.

Nello specifico, recenti esperimenti di imaging cerebrale hanno mostrato che un ruolo importante nell'apprendimento dell'imitazione è svolto dal lobo prefrontale (Buccino et al. 2004). Questo lobo e l'area 46, in particolare, sembrano essere la struttura che combina atti motori elementari (ad esempio, movimenti specifici delle dita) in schemi motori più complessi. Dunque, la prima fase del processo imitativo è svolta dal Sistema Specchio, mentre la seconda è più dovuta all'attività del lobo prefrontale, e in particolare dell'area 46 che ricombina e memorizza gli elementi motori del nuovo schema.

Il Sistema Specchio fornisce una copia motoria delle azioni osservate. Pertanto, sembra essere il meccanismo ideale per l'imitazione. Tuttavia, le scimmie, che hanno un sistema speculare, possiedono questa capacità in una forma molto limitata, (Visalberghi & Fragaszy, 2001). Le scimmie comprendono l'obiettivo dell'azione osservata e possono emularlo (cioè, raggiungere il suo obiettivo), ma hanno un meccanismo speculare troppo primitivo per codificare i dettagli dell'azione osservata, manifestando così l'impossibilità di replicarla (Rizzolatti & Craighero, 2004).

L'imitazione motoria volontaria permette di interagire con gli altri condividendo volontariamente stati comportamentali. È una potente risorsa biologica per lo sviluppo cognitivo (Meltzoff e Moore, 1977), l'interazione sociale (Chartrand & Bargh, 1999) e l'apprendimento motorio (Byrne & Russon, 1998). Processi di imitazione alterati potrebbero dare origine a comportamenti anomali, come nel caso del comportamento di imitazione compulsivo (Lhermitte et al, 1986; Pandey & Sarma, 2015). Un'altra condizione patologica legata ai meccanismi di imitazione è l'aprassia, definita come la difficoltà a produrre gesti su comando verbale o per imitazione. Questi sono esempi di sintomi cognitivi non legati alla memoria nell'AD. Diversi studi che hanno caratterizzato la relazione tra la progressione della malattia e i diversi tipi di aprassia hanno generato risultati contrastanti (Edwards et al., 1991; Travniczek-Marterer et al., 1993). Mentre alcuni ricercatori hanno riportato maggiori difficoltà nell'esecuzione di gesti transitivi

(Rapcsak et al., 1989), altri hanno dimostrato che i pazienti AD erano per lo più compromessi nell'imitazione di pantomime e movimenti senza significato (intransitivi), questi ultimi spiegati come causati da un'alterazione dell'analisi visuo-spaziale (Rousseaux et al., 2012).

2.4 Sistema specchio e AD: prime evidenze comportamentali e di neuroimaging

Anche se l'AD e l'MCI sono state finora caratterizzate come malattie "cognitive", nell'ultimo decennio è stato sempre più riconosciuto un legame tra la funzione motoria e il rischio di sviluppare l'AD. Difatti, è stato dimostrato che sia un livello inferiore che un tasso più rapido di declino motorio in individui cognitivamente intatti, predice il successivo sviluppo di MCI e AD, e la perdita della funzione motoria può precedere il deterioramento cognitivo di diversi anni (Verghese et al., 2008).

Altri studi dimostrano che l'attività fisica è ricorrentemente associata a una minore incidenza della demenza e a una migliore cognizione nei pazienti affetti (Groot et al., 2016). In questo contesto, lo studio dei neuroni specchio è stato considerato di particolare interesse, in quanto popolazione neuronale che collega percezione e azione, e anche cognizione e motricità. Caratterizzare il funzionamento della rete dei neuroni specchio nelle malattie neurodegenerative, nello specifico, sarebbe utile per una migliore comprensione dei meccanismi funzionali alla base delle manifestazioni cliniche e permetterebbe anche di considerare tale sistema nella riabilitazione dei sintomi motori e cognitivi. A tal riguardo, vi sono state alcune proposte teoriche nell'interpretare le malattie neurodegenerative, in particolare la sclerosi amiotrofica e la demenza frontotemporale, come legate alla disfunzione dei circuiti di percezione - azione, tra cui la stessa rete dei neuroni specchio (i.e., Bak, 2013). Tuttavia, gli studi diretti sul funzionamento della rete del Sistema Specchio attraverso tecniche di neuroimaging o neurofisiologiche sono attualmente pochi in letteratura. Tra questi, Moretti nel 2016 ha condotto un esperimento EEG e di risonanza magnetica

morfologica in cui si dà sostegno all'ipotesi che un disaccoppiamento patologico del Sistema Specchio con malfunzionamento delle aree IPL potrebbe spiegare i deficit cognitivi nell'AD prodromico (Moretti, 2016). Mentre, per quanto riguarda la riabilitazione, l'articolo di Eggermont et al. del 2009 (Eggermont et al., 2009) è uno dei pochi presenti in letteratura, e pone il focus sull'attivazione del Sistema Specchio per migliorare le prestazioni cognitive in pazienti AD.

In tale contesto, appare dunque importante indagare lo stato di conservazione del Sistema Specchio nel deterioramento cognitivo e neurodegenerativo. A tal riguardo, lo studio di Farina e collaboratori (2017) è esemplificativo, in quanto pone come obiettivo quello di indagare l'integrità della rete dei neuroni specchio nell'invecchiamento normale, MCI e AD (Farina et al., 2017). Per raggiungere tale scopo, sono stati valutati tre gruppi di soggetti: anziani sani, persone affette da MCI e pazienti con AD attraverso un compito fMRI caratterizzato da una condizione di osservazione, nella quale i soggetti osservavano dei video dove veniva presentata una mano che afferrava diversi oggetti, e da una condizione di esecuzione, sotto forma di pantomima, nella quale ai soggetti venivano presentati visivamente degli oggetti e veniva chiesto loro di eseguire un afferramento con la mano destra appropriato al tipo di oggetto visto, ripetendo il movimento fino all'introduzione dell'immagine successiva.

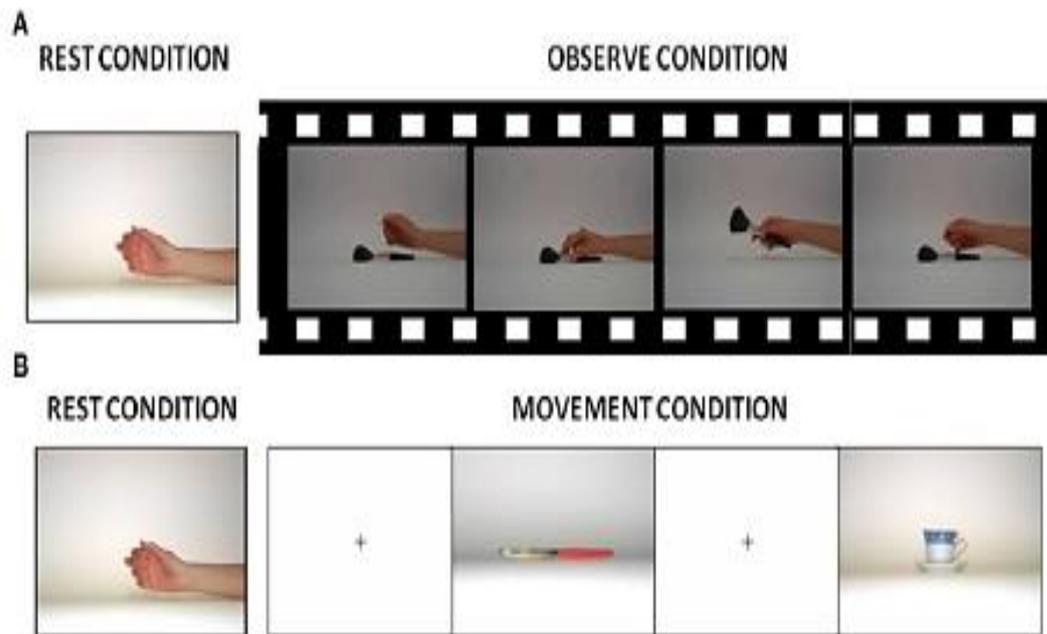


Figura 6: Studio di Farina et al. (2017): stimoli visivi presentati ai soggetti in ogni condizione sperimentale. (A) immagine utilizzate durante la condizione di riposo e di osservazione; (B) Immagini mostrate ai soggetti durante la condizione di riposo e di esecuzione.

L'analisi di congiunzione, ottenuta confrontando l'attivazione fMRI durante l'osservazione della presa della mano transitiva e l'esecuzione dei movimenti di presa, ha mostrato delle differenze tra i tre gruppi. Nello specifico, nei soggetti sani è stata rilevata un'attivazione bilaterale del network fronto-parietale, costituito dal giro precentrale (area 6) e dall'IPL, insieme ad un'attivazione del giro temporale superiore destro e del giro fusiforme destro. Dunque, nel gruppo di controllo è stata riscontrata un'attivazione di una rete fronto-parietale bilaterale, fortemente lateralizzata a sinistra, considerata parte della rete dei neuroni specchio umana, e un'attivazione del STG, considerata un'area fortemente associata all'attivazione del sistema specchio negli esseri umani. Nel complesso, dunque, la rete dei neuroni specchio sembrerebbe essere conservata nell'invecchiamento, anche se perde la sua specificità.

Nei soggetti MCI è stata riscontrata un'attivazione dello stesso network fronto-parietale, con un'attivazione minore delle aree parietali, come l'IPL, rispetto ai soggetti sani, con l'aggiunta di un'attivazione bilaterale del cervelletto, della corteccia

premotoria ventrale sinistra, della corteccia premotoria destra e dell'area di Broca (giro frontale inferiore sinistro). Un'attivazione simile delle aree frontali e parietali è stata riscontrata dunque nel gruppo MCI, confermando la conservazione del sistema specchio nei pazienti, anche se è stata registrata in questi ultimi una maggiore attivazione delle aree frontali, confermando in questo gruppo una maggiore resilienza al processo di invecchiamento delle aree specchio situate nella parte anteriore del cervello, rispetto alle aree posteriori.

Nei pazienti AD, infine, non è stata registrata alcuna attivazione della rete fronto-parietale, ma solo un'attivazione bilaterale del giro fusiforme e un'attivazione del cervelletto nell'emisfero sinistro. A tal riguardo, gli autori avrebbero interpretato tale risultato come un coinvolgimento del sistema specchio nel declino cognitivo neurodegenerativo, che apparirebbe dunque deficitario nei pazienti AD. Queste osservazioni sono in linea con altri studi MRI che hanno dimostrato come nei pazienti AD ed MCI, rispetto a pazienti con altre patologie neurologiche, ci sia un'atrofia cerebrale posteriore nelle prime fasi della patologia maggiormente a carico delle aree parietali, come la PPC e il precuneo (Likeman et al., 2005; Head et al., 2004; Stebbins e Murphy 2009).

Questo studio avrebbe inoltre confermato la possibilità che i pazienti AD e MCI attivino aree compensatorie per eseguire il compito: ad esempio, è stato suggerito che il cervelletto fornisca l'errore di previsione per l'IFG e l'IPL, per regolare i modelli interni (Miall, 2003; Oh et al., 2012). In questo contesto, l'attivazione nel paziente AD dei neuroni cerebellari coinvolti nella rete dei neuroni specchio corrisponderebbe ad un tentativo di compensare i danni delle aree prefrontali e parietali, e questo meccanismo sarebbe già presente nell'MCI, dunque in una fase prodromica della malattia.

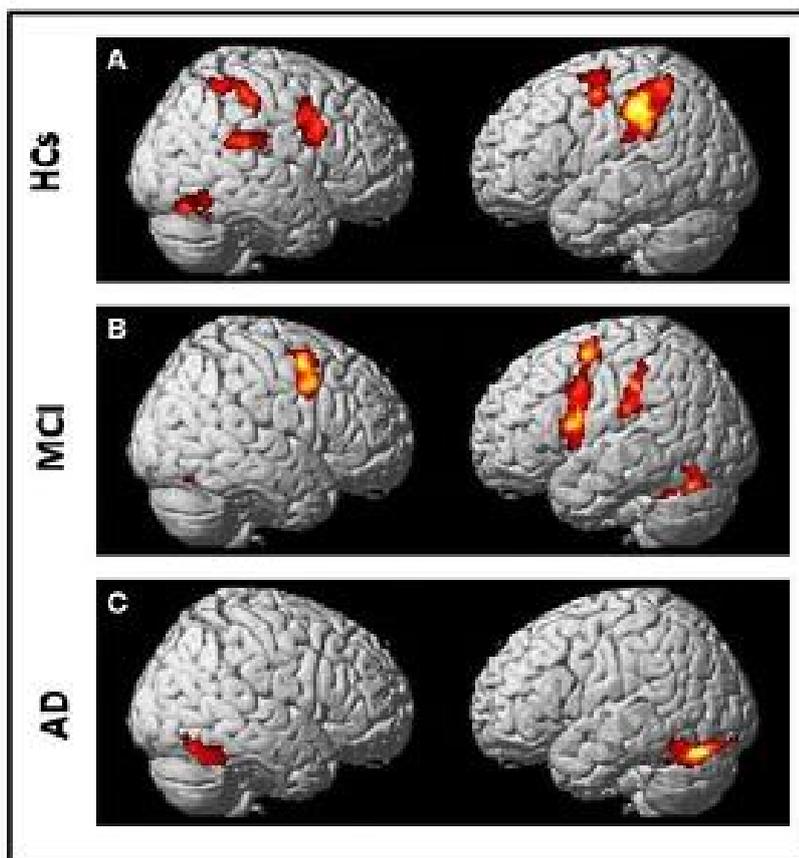


Figura 7: *Analisi di congiunzione confrontando l'attivazione fMRI durante l'osservazione della presa di mano transitiva e l'esecuzione dei movimenti di presa risultati rispettivamente in (A) gruppo anziani normali; (B) gruppo Mild Cognitive Impairment (MC) e (C) gruppo malattia di Alzheimer (AD). Immagine tratta da Farina et al., 2017.*

Per quel che concerne la capacità imitativa in pazienti AD, è noto che essa possa essere negativamente influenzata da carenze visive, poiché richiede un'intensa elaborazione visuospatiale e la capacità di abbinare la postura e i movimenti del modello con il proprio repertorio motorio (Goldenberg, 1999). Inoltre, è noto che i pazienti AD presentano deficit di attenzione, che influiscono sulla loro capacità di concentrarsi sulle modificazioni dello stimolo e di seguire le istruzioni elementari (Perry & Hodges, 1999), nonché quella di imitare una caratteristica specifica del movimento osservato. Un'altra fonte di difficoltà nell'imitazione volontaria potrebbe essere il tipo di stimolo che i pazienti AD devono riprodurre. Infatti, l'AD presenta anche disfunzioni

visive, come la discriminazione del colore (Cronin-Golomb, 1993) e il riconoscimento della forma.

Alcuni studi (Bisio et al. nel 2016), dimostrerebbero che, sebbene l'AD si manifesti principalmente come deficit cognitivo, i processi sensorimotori impliciti che sono alla base delle interazioni sociali, come l'imitazione automatica, sembrano essere preservati negli stadi lievi e moderati della malattia, ma non i meccanismi volontari espliciti, che richiedono maggiore attenzione agli eventi esterni da parte del paziente. Nello specifico, lo studio in questione era volto ad indagare se l'imitazione volontaria, cioè un meccanismo volitivo che implica l'osservazione dell'azione di un'altra persona e la traduzione di questa percezione nella propria azione, fosse preservata nei pazienti AD. Inoltre, gli studiosi hanno testato se questa capacità fosse modulata dalla natura dello stimolo osservato confrontando la capacità di riprodurre le caratteristiche cinematiche di un dimostratore umano con quella di uno stimolo computerizzato. Precisamente, i soggetti, suddivisi in gruppo di pazienti AD e in un gruppo di controllo, dovevano osservare e riprodurre la velocità di uno stimolo astratto, generato dal computer (un punto che si muoveva verso l'alto su uno schermo) e di un dimostratore umano, che stava di fronte ai partecipanti ed eseguiva movimenti di puntamento verso l'alto con il braccio destro. In quest'ultimo caso, la risonanza motoria conservata avrebbe potuto consentire l'imitazione volontaria.

I risultati hanno dimostrato che i pazienti AD presentano una capacità intatta di riprodurre la velocità dei movimenti osservati, in particolare quando lo stimolo da imitare era umano, come confermato dalla descrizione quantitativa delle fasi di pianificazione ed esecuzione del movimento dei partecipanti attraverso l'analisi del tempo di reazione (RT) e la velocità media impiegata. Questo risultato suggerisce che i processi cognitivi di alto livello coinvolti nell'imitazione volontaria potrebbero essere preservati negli stadi lievi e moderati della malattia e potrebbero essere sfruttati durante programmi di *training* e di interventi riabilitativi cognitivi. In modo più speculativo, la

capacità preservata di far corrispondere le caratteristiche cinematiche del modello visivo con il repertorio motorio interno potrebbe aver guidato la fase di pianificazione iniziale della risposta motoria dei pazienti AD e aver aiutato i partecipanti a replicare volontariamente la cinematica del modello.

È bene specificare che sia nello studio descritto (Bisio et al., 2016), sia in uno studio precedente (Bisio et al., 2012), i pazienti AD - rispetto ai controlli sani - presentano una risposta anticipatoria: dunque, mentre l'imitazione automatica dello stimolo suggerisce una capacità intatta di abbinare le rappresentazioni motorie interne con quelle del modello visivo, l'inizio incontrollato del movimento indicherebbe la difficoltà dei pazienti AD di inibire volontariamente la produzione della risposta. I compiti che coinvolgono l'inibizione controllata si basano sull'attività di diverse strutture distribuite nel cervello, comprese le regioni frontali e le loro connessioni corticali e nell'AD, a causa della disfunzione delle aree associative, vi sarebbe l'incapacità comunicativa tra queste aree provocando l'esecuzione immediata dell'output motorio in risposta all'osservazione del movimento.

I pazienti MCI e AD sperimentano anche cambiamenti nella funzionalità delle reti cognitive cerebrali e, nello specifico, regioni legate alla MLT e regioni funzionalmente connesse alla MLT.

Nei pazienti AD da lieve a moderato sono state riscontrate ridotte attivazioni della MLT quando i soggetti cercano di imparare nuove informazioni (i.e., Celone et al., 2006). A tal riguardo, è stata ipotizzata una traiettoria non lineare delle attivazioni fMRI legate alla memoria nel corso dell'AD prodromico che include una fase di iperattivazione MTL nelle fasi iniziali, seguita da una diminuita attivazione MTL nelle fasi successive di MCI e AD lieve. Tuttavia, non è ancora chiaro se la natura di tali cambiamenti funzionali siano dovuti principalmente al danno strutturale MTL o, al contrario, al riflesso di un ricambio non specifico della rete neuronale associato ad una perdita di tessuto cerebrale.

A tal riguardo, lo studio di Agosta et al. del 2017 (Agosta et al., 2017) è concentrato sulla valutazione delle reti motorie che appaiono essere risparmiate nei pazienti AD. Il risultato principale di questo studio è che, in MCI e AD senza compromissione clinica motoria, i cambiamenti fMRI si verificano anche nel sistema motorio, simile a quelli descritti per la rete cognitiva. È stato trovato infatti un aumento dell'attività di diverse regioni della rete sensorimotoria in MCI rispetto all'AD e, anche se più debolmente, ai controlli sani, tra cui il giro postcentrale e il nucleo caudato. Tali risultati suggeriscono che alcune delle aree della rete sensorimotoria, in particolare la SMC e la testa del caudato, mostrano una traiettoria non lineare di attivazione caratterizzata da una fase iniziale di iperattivazione nell'MCI, seguita da una fase di ipoattivazione nei pazienti AD.

Infine, in uno studio fMRI condotto da Rattanachayoto e colleghi (2012), l'obiettivo è stato quello di esaminare le anomalie del Sistema Specchio negli anziani con MCI e AD. Novantadue soggetti (5 con MCI, 7 con AD lieve e 80 cognitivamente normali) sono stati studiati utilizzando l'fMRI: nello specifico, ai partecipanti è stato chiesto di osservare un video che mostrava il movimento della mano (strappare un pezzo di carta) e una condizione di controllo (osservare un punto di fissazione). I risultati hanno riportato delle attivazioni del lobulo parietale inferiore dovute all'osservazione del movimento della mano, ma tali attivazioni erano statisticamente superiori nel gruppo di controllo rispetto a quelle dei gruppi MCI e AD lieve, suggerendo che la disfunzione di alcune aree tipiche del Sistema Specchio possa essere alla base dei disturbi cognitivi nei pazienti con MCI e AD (Rattanachayoto et al., 2012).

OBIETTIVI DELLO STUDIO E IPOTESI

Il presente studio fMRI ha come scopo generale quello di indagare la capacità imitativa e i correlati neurali durante un compito di imitazione di azioni in pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) e Mild Cognitive Impairment (MCI). Lo scopo specifico è

quello di indagare l'attivazione cerebrale del Sistema Specchio in pazienti MCI e in pazienti AD di grado lieve durante un compito di osservazione e imitazione di azioni complesse, bimanuali, eseguite da un modello. Date le numerose evidenze sul ruolo del Sistema Specchio come correlato neurale dell'imitazione e dell'apprendimento motorio nei soggetti sani (i.e., Rizzolatti et al., 2014), l'ipotesi del presente studio riguarda un'attivazione differenziale di questo sistema a seconda della fase della malattia neurodegenerativa (MCI, prodromica; AD, conclamata). Come detto in precedenza, attualmente non sono presenti numerosi dati in letteratura per quel che concerne la capacità imitativa e l'attivazione del Sistema Specchio nei pazienti AD e MCI, e, per quel che riguarda i risultati presenti (Farina et al., 2017; Farina et al., 2020), vi sono dati non del tutto chiari rispetto al funzionamento e all'organizzazione del Sistema Specchio in questi pazienti durante compiti di osservazione e di imitazione di azioni.

Nello specifico, basandosi sulle diverse evidenze relative alle proprietà del sistema specchio è possibile ipotizzare che:

- a) nei pazienti MCI vi sia una maggiore attivazione del Sistema Specchio rispetto ai pazienti AD;
- b) l'attivazione del Sistema Specchio dovrebbe dipendere dal gradiente cerebrale di coinvolgimento caudo-rostrale (postero-anteriore) descritto in letteratura, ovvero nei pazienti MCI ci si aspetta una maggiore attivazione delle aree frontali rispetto alle aree parietali, e nei pazienti AD una diminuzione generale dell'attivazione in tutte le aree del Sistema Specchio;
- c) come effetto di una possibile compensazione, si ipotizza che nelle fasi tardive della malattia (AD) rispetto alla fase prodromica (MCI) vi sia il reclutamento di aree corticali e sottocorticali che inizialmente non sono reclutate in modo sistematico durante l'imitazione delle azioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Partecipanti

Lo studio fMRI è stato svolto presso il reparto di Neuroradiologia - Risonanza magnetica 3 Tesla - dell'Ospedale Torre delle Medicine di Parma. Per il reclutamento del campione, sono stati selezionati 21 soggetti di controllo sani e 7 pazienti con diagnosi di MCI o di Alzheimer lieve.

Entrando nel dettaglio, il gruppo di controllo presenta un'età media pari a 63 anni ($M=63.6$; $DS=6.1$), mentre il campione dei pazienti è costituito da 4 maschi e 3 femmine, con un'età media di 68 anni ($DS=6.1$) e una scolarità media di 12 ($DS=4.4$). All'interno di questo gruppo, un'ulteriore categorizzazione è stata effettuata tra i pazienti con diagnosi di MCI ($n = 3$) e i pazienti con diagnosi biologica conclamata di AD lieve ($n = 4$). I due gruppi non risultano significativamente diversi in merito all'età ($U = 119.5$; $p = 0.14$).

Sia i pazienti che i controlli sono stati selezionati secondo specifici criteri di inclusione. Per quel che concerne il gruppo dei pazienti, i fattori presi in considerazione sono i seguenti:

1. Diagnosi clinica di MCI secondo i criteri di Petersen (Albert et al., 2011) o di AD secondo i criteri NIA-AA (McKhann et al., 2011). In aggiunta alla diagnosi clinica, nei pazienti AD è presente, inoltre, una diagnosi biologica del pattern neuropatologico sottostante di tipo AD ottenuta mediante o la positività dei biomarkers secondo il profilo AT(N) su liquor o la positività di una PET amiloide come suggerito dai criteri NIA-AA aggiornati al 2018 (Jack et al., 2018);
2. Età compresa tra i 50 e gli 70 anni al momento del reclutamento;
3. Punteggi grezzi al test di screening neuropsicologico (MMSE) ≥ 18 ;

4. Grado di collaborazione e comprensione sufficienti per partecipare allo studio comportamentale nel giudizio del medico che ha in cura il paziente;
5. Assenza di compromissioni sensoriali che possano limitare la partecipazione allo studio, specialmente importanti deficit visivi.

Per quanto riguarda il gruppo di controllo, invece, sono stati selezionati i soggetti che non presentavano malattie neurologiche o particolari anomalie cerebrali conclamate. Sono stati dunque esclusi i soggetti con epilessia, tumori, neoformazioni, ictus, ischemie e altre simili cause. Inoltre, poiché lo studio veniva svolto in risonanza, sono stati inclusi solo i partecipanti non portatori di corpi metallici, pacemaker, defibrillatori cardiaci e stimolatori midollari o portatori di materiali metallici non RM compatibili, come chiodi, viti, protesi o valvole cardiache, onde evitare il surriscaldamento con i campi magnetici prodotti dalla risonanza stessa. Ai fini della selezione i partecipanti sono stati invitati a compilare preliminarmente all'esame fMRI un apposito modulo in cui venivano elencati i possibili rischi e le opzioni sopra citate, così da poterlo presentare tempestivamente al Neuroradiologo, che, solo a seguito di un'attenta analisi delle risposte ottenute, avrebbe confermato la compatibilità del soggetto allo studio proposto.

Lo studio sui volontari sani è stato approvato dal comitato etico locale AVEN (codice NEUROIMAGE_UNIPR). I partecipanti hanno fornito il loro consenso informato in conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

3.2 Valutazione neuropsicologica

Per la valutazione clinica e neuropsicologica i pazienti sono stati sottoposti ad una serie di test neuropsicologici, volti ad analizzare le funzioni cognitive generali (memoria, funzioni visuospatiali, prassia costruttiva, abilità di linguaggio, ecc.). Nello specifico, alcuni test sono stati eseguiti durante la visita neurologica del workout

completo di I livello per disturbi cognitivi, mentre un'ulteriore testistica è stata applicata il giorno stesso dell'esperimento, prima di sottoporre il paziente all'esame fMRI.

Più dettagliatamente, i test neuropsicologici eseguiti il giorno dell'esperimento sono:

1. *Test di Corsi* (Mammarella et al., 2008) per esaminare la memoria a breve termine;
2. *Denominazione di azioni* (Capasso e Miceli, 2011) per studiare le abilità linguistiche;
3. *Test dell'Orologio* (Caffarra et al., 2011) ed il *Test di cancellazione di campanelle* (Vallar et al., 1994) per indagare la prassia costruttiva e le funzioni visuospatiali;
4. *Test di Aprassia* (De Renzi et al., 1980) per studiare l'aprassia ideomotoria.

I test che invece sono stati eseguiti durante l'esame neuropsicologico clinico sono i seguenti:

1. *MoCA* (Santangelo, 2015) per ottenere un punteggio di riferimento allo screening cognitivo;
2. *Digit span forward e backward* (Monaco, 2013) per indagare la memoria a breve termine;
3. *Free and Cued Selective Reining Test* (FCSRT) (Frasson, 2011) e la *Figura di Rey* differita (Caffarra, 2002) per esaminare la memoria a lungo termine;
4. *Screening for Aphasia NeuroDegeneration* (SAND) (Catricalà, 2017) per studiare le abilità linguistiche;
5. *Multiple Feature Cancellation Test* (MFTC) (Marra, 2013) e lo *Stroop Test* (Caffarra, 2002) per indagare l'attenzione e le funzioni esecutive;

6. *Copia della Figura di Rey* (Caffarra, 2002) per esaminare la prassia costruttiva e le funzioni visuospaziali.

Il gruppo di controllo, invece, è stato valutato, prima della sessione fMRI, mediante il test MMSE (Measso et al., 1993), in modo da confermare l'assenza di deficit cognitivi, e dunque l'adeguatezza dei soggetti reclutati nel gruppo di controllo.

Per uniformare i punteggi dello screening neuropsicologico tra il gruppo di pazienti e il gruppo dei sani, e utilizzarli successivamente ai fini statistici, i punteggi MoCA ottenuti dai pazienti sono stati convertiti in punteggi equivalenti MMSE mediante i criteri descritti da Bergeron e collaboratori (2017).

3.3 Disegno Sperimentale dello studio fMRI

Lo studio proposto consisteva in un'unica sessione fMRI e prevedeva due compiti sperimentali: un compito di osservazione passiva (OBS), ed uno di imitazione di azioni (IMI).

L'azione era volta a ottenere, con un foglio di carta, la configurazione di un origami. Tale compito è stato precedentemente testato da un punto di vista comportamentale mediante uno studio pilota realizzato su 10 pazienti AD, a cui è stato proposto di imitare diversi compiti manuali. Dai risultati di questo pilota è emersa una buona abilità imitativa dei pazienti in questo specifico compito.

I compiti di OBS ed IMI sono stati suddivisi in due RUN, composte da otto sequenze ciascuna, di breve durata, evitando così un eccesso di stanchezza o un calo di attenzione da parte dei partecipanti. Per entrambi i compiti è stato adoperato un disegno sperimentale *event-related*.

Il compito di osservazione di azioni prevedeva due RUN sperimentali equivalenti della durata di 7 minuti e 46 secondi ciascuna. Durante ogni RUN, i partecipanti erano

invitati ad osservare con attenzione dei filmati della durata di 16 secondi in cui venivano mostrate delle azioni bimanuali, da una prospettiva soggettiva, consistenti in 3 passaggi e 3 pieghe di un foglio di carta, sempre diversi in base al tipo di sequenza, in modo da formare diverse configurazioni di origami senza significato, escludendo così la possibilità che il soggetto potesse riconoscere la configurazione finale prodotta. A tal proposito, sono stati selezionati tre colori differenti del foglio piegato dal modello (verde, arancione e celeste) per incrementare la variabilità dei *trial*/stessi.

Per poter essere presentati durante la sessione fMRI, i video utilizzati sono stati editati temporalmente con il programma *Movavi Video Editor Plus 2020* in modo da poter durare ciascuno 16 secondi, all'interno dei quali 800 ms all'inizio e al termine del video erano destinati ad un fermo immagine con le mani ferme, rispettivamente nella posizione di partenza e nella posizione finale. Dal video, utilizzando il programma *Avidemux 2.7.5*, è stata successivamente rimossa la traccia audio ed è stato attuato un *resize* di 760x428 con l'aggiunta di 4 bordi, dalle dimensioni rispettive di 20 cm (sinistro e destro) e di 86 cm (alto e basso) in modo tale da raggiungere la risoluzione finale di 800x600. Infine, a ciascun video è stata aggiunta al centro una croce di fissazione bianca. Il video così editato è stato quindi esportato a 50 FPS in formato MPEG ASP (xvid4) ed è stato sottoposto ad un processo di codifica a due passate impostando la dimensione finale ad 1 MB.

3.3.1 Compito di osservazione (OBS)

Il compito di osservazione era suddiviso in due condizioni, una sperimentale (1), e una di controllo (2) (Fig.8):

1. Osservazione di mani che manipolano il foglio attraverso una sequenza motoria bimanuale (OBS FOLD);
2. Osservazione di mani che ripetutamente raggiungono, toccano il foglio e

tornano in posizione di partenza senza interagire con il foglio (OBS REACH).

Le caratteristiche visive sono state bilanciate fra le diverse condizioni sperimentali in modo da controllare possibili effetti legati a differenze di luminosità, contrasto, nitidezza e quantità di informazione visiva. Sono stati preparati in tutto 24 filmati, dei quali 16 per la condizione OBS FOLD e 8 per la condizione OBS REACH.

Dei filmati OBS_FOLD, 8 possibili sequenze sono state presentate in colori diversi, ossia:

1. sequenze 1, 2, 3, 4, 5, 6 verde;
2. sequenze 2, 3, 4, 7, 8 arancione;
3. sequenze 1, 5, 6, 7, 8 celeste.

Riguardo ai filmati OBS_REACH, 3 possibili sequenze sono state presentate in colori diversi: verde, arancione e celeste.

Sia nella run 1 che nella run 2 sono state presentate, in modo controbilanciato, tutte le sequenze diverse appartenenti alla condizione OBS FOLD e tutte le sequenze diverse della condizione OBS REACH. Ogni run funzionale è caratterizzata da una successione di eventi per cui vi era la presentazione di un video di 16 secondi appartenente alla condizione OBS_FOLD o alla condizione OBS_REACH seguito da un periodo di riposo (Rest), necessario a far ritornare il segnale BOLD alla condizione di baseline, della durata di 12 secondi. Durante tale periodo di riposo è stata presentata una croce bianca di fissazione su sfondo nero. La successione di eventi video-rest (croce bianca) si è ripetuta, per ciascuna run, 16 volte.

Alla fine del compito, i partecipanti erano invitati a scendere dalla loro postazione per seguire lo sperimentatore in un'altra sala, in modo da non stancarsi eccessivamente e così da apprendere le successive istruzioni che avrebbero riguardato il compito successivo, ossia quello di imitazione (IMI).



Figura 8: *esempio del disegno sperimentale: compito di osservazione (OBS).*

3.3.2 Compito di imitazione di azioni (IMI)

Durante la terza e quarta run è stato svolto il compito di imitazione. Anche in questo caso, come per la condizione OBS, sono stati mostrati dei video della durata di 7 minuti e 10 secondi ciascuno, in cui i partecipanti erano istruiti ad osservare inizialmente le mani dell'attore manipolare il foglio, per poi eseguire la stessa procedura dopo l'istruzione indicata da un grande cerchio verde (segnale di via).

In questa condizione, infatti, lo sperimentatore era presente in sala risonanza, per presentare al partecipante il materiale (fogli di carta, dimensioni 20x20 cm) nell'esatto momento in cui avrebbe dovuto eseguire il compito di imitazione. Le istruzioni sulle tempistiche del compito sono state fornite allo sperimentatore mediante apposite cuffie. Inoltre, è stato utilizzato un supporto in legno (una sorta di tavolino) posizionato sull'addome del partecipante, sul quale poteva appoggiare le mani, per eseguire il compito richiesto. Anche per questo compito è stato utilizzato un disegno sperimentale *event-related*.



Figura 9: Esempio del disegno sperimentale: compito di imitazione (IMI)

Durante il compito il partecipante indossava dei visori, per cui non poteva vedere le proprie mani, né vedere quando lo sperimentatore avrebbe consegnato il foglio per eseguire il compito. Ciascuna run (Fig.9) era costituita da una successione di eventi caratterizzati dalla presentazione iniziale di una schermata di istruzione della durata di 2 secondi nella quale veniva presentata la scritta "Osserva" (INSTR). Successivamente, vi era la presentazione del video del modello, da osservare attentamente, dalla durata di 16 secondi (OBS TO IMI) in cui sono stati utilizzati, in maniera casuale, gli stessi 16 video usati nelle run di OBS. Al termine del video veniva presentata al soggetto una schermata con la scritta "Ripeti l'azione" (PREP) della durata di 2 secondi, in modo da prepararlo al compito. Subito dopo, seguiva la presentazione di un grande cerchio verde che indicava al soggetto la condizione di esecuzione, ossia quella di imitare l'azione precedentemente osservata (EXE). Contemporaneamente a questa fase, lo sperimentatore consegnava al partecipante il foglio per eseguire il trial.



Figura 10: *Illustrazione esemplificativa del setting in risonanza magnetica per l'esecuzione del compito fMRI: il soggetto è disteso in posizione supina e indossa dei visori LCD per l'osservazione dei video. Un supporto amagnetico, posizionato sull'addome, serviva per eseguire il compito di imitazione (IMI). Immagine pubblicata con il consenso del partecipante.*

Il compito di imitazione aveva una durata di 16 secondi al termine dei quali lo sperimentatore rimuoveva il foglio dalle mani del soggetto. Infine, dopo la fase di EXE, seguiva un periodo di riposo della durata di 16 secondi (Rest), che prevedeva che il partecipante rimanesse fermo mantenendo lo sguardo sulla croce di fissazione bianca. La successione di eventi istruzioni-video-preparazione-imitazione-rest veniva ripetuta, per ciascuna run, 8 volte, equivalenti ciascuna a 16 secondi.

Per eseguire l'intera procedura sperimentale, comprendente la fase iniziale di

analisi morfologica (BRAVO MIK) e poi i compiti OBS ed IMI, il soggetto era impegnato per circa 45 minuti all'interno dello scanner.

PROCEDURA SPERIMENTALE

Entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad una valutazione neuropsicologica che, nel caso dei pazienti, consisteva in una più lunga testistica rispetto ai soggetti sani, ai quali venivano somministrati solo il test MMSE e l'Edinburgh Test, come descritto in precedenza. I test così compilati dallo sperimentatore venivano poi inseriti in un apposito blocco, per essere analizzati successivamente per lo scoring.

Le istruzioni dell'esperimento sono state fornite verbalmente al partecipante e sono state suddivise in due parti: inizialmente, al soggetto venivano fornite le informazioni relative al solo compito di osservazione (OBS), anche grazie al supporto di un apposito foglio A4 in cui erano illustrate parti esemplificative di eventi che il soggetto avrebbe visto in risonanza. Poiché i partecipanti avrebbero dovuto indossare dei visori per osservare i video, è stato richiesto preliminarmente allo studio se vi fossero gravi problemi di vista. In caso contrario, lo sperimentatore avrebbe semplicemente corretto le lenti con la giusta gradazione per facilitare al partecipante la visione.

Nel caso dei pazienti, per evitare di rendere troppo difficile il compito nello scanner, reso già di per sé non semplice dal fatto che i partecipanti non avevano la possibilità di vedere le loro mani durante l'esecuzione delle pieghe sul foglio, un *training* con funzione di *catch trials* è stato eseguito durante la spiegazione del compito al partecipante fuori dallo scanner. Tale training prevedeva la presentazione di 10 video, analoghi a quelli presentati nell'esperimento vero e proprio all'interno dello scanner, che riproducevano delle mani che eseguivano delle pieghe con un foglio di carta

colorato (verde, arancione o celeste): al partecipante veniva richiesto di osservare il video e, quando esso si interrompeva, di rispondere il più velocemente possibile, premendo il tasto destro o il tasto sinistro della tastiera, indicando il colore del foglio che aveva visto piegare dal modello scegliendo tra due possibili alternative di colore presentate sullo schermo del PC sulla destra o sulla sinistra (tasto destro per indicare il colore sulla destra dello schermo, tasto sinistro per indicare il colore sulla sinistra dello schermo). Prima dei *catch trials* veri e propri ai partecipanti è stata presentata una prova d'esempio. Per la presentazione degli stimoli e la registrazione delle risposte è stato utilizzato il software *E-Prime 2 Professional* (Psychology Software Tools, Inc., <http://www.pstnet.com>). Infine, ai partecipanti è stata fornita l'indicazione di non eseguire nessun movimento durante il compito di osservazione nello scanner, ma di concentrarsi esclusivamente sullo schermo e sulle mani dell'attore che eseguiva il compito. Subito dopo, i partecipanti venivano invitati a prepararsi per la procedura di acquisizione delle immagini funzionali ed entravano nello scanner in posizione supina.

Gli stimoli visivi venivano presentati in visione binoculare, mediante l'uso di visori LCD (VisuaStim-SVGA, Resonance Technology, USA) dotati di una risoluzione 800x600 pixel, un campo visivo orizzontale di 30° e un refresh rate di 60 Hz. Inoltre, è stato utilizzato un sistema di cuffie con meccanismo pneumatico per attutire di 30 dB il rumore provocato dal sistema MR durante la seduta. Il segnale digitale è stato trasmesso allo scanner mediante fibra ottica.

Prima dell'esperimento vero e proprio, sono state acquisite le immagini morfologiche del cervello dei soggetti (BRAVO MIK). Una volta acquisite le immagini morfologiche, i partecipanti svolgevano le due run funzionali del compito di osservazione della durata di 7 minuti e 46 secondi ciascuna (15 minuti e 32 secondi totali) intervallate da uno o due minuti di pausa trascorsi all'interno dello scanner. Al termine del compito di osservazione, i partecipanti erano invitati ad uscire dallo scanner e venivano accompagnati in una sala dove venivano fornite le istruzioni per il compito

successivo, ossia quello di imitazione di azioni (IMI). Anche in questo caso, tramite l'utilizzo di un foglio A4 contenente una rappresentazione grafica delle stesse, venivano fornite indicazioni verbali dettagliate sul compito, invitando caldamente i soggetti a non eseguire movimenti troppo bruschi durante l'esecuzione, di cercare il più possibile di rimanere fermi con la testa e di limitare i movimenti delle mani per non coinvolgere il movimento delle braccia o delle spalle, che avrebbero creato rumore per le analisi fMRI. Una volta compreso il compito, i partecipanti venivano riaccompagnati all'interno dello scanner dove procedevano con l'esecuzione delle due run funzionali del compito di esecuzione di azioni (IMI), intervallate da uno o due minuti di pausa. Durante le due run di imitazione la performance del partecipante è stata videoregistrata tramite una videocamera GoPro posizionata di fronte allo schermo nella sala di acquisizione, ripresa a sua volta da una videocamera posta all'interno dello scanner sopra la sua testa. In questo modo, era possibile ottenere i tempi effettivi di esecuzione e poter confrontare, attraverso un'analisi successiva video-based, la procedura eseguita dal soggetto con quella eseguita dall'attore, quantificando così la sua performance imitativa.

3.4 Acquisizione dei dati di risonanza magnetica

Le immagini morfologiche e funzionali sono state acquisite mediante il tomografo operante a 3 Tesla (GE Discovery MR750), sito presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma (PR), equipaggiato con una bobina di ricezione testa ad 8 canali. Tutte le immagini funzionali sono state acquisite mediante sequenza T2* Gradient-Echo Echo Planar Imaging (EPI) con TR = 2000 ms e 40 slices. Per ciascuna delle run di osservazione sono stati acquisiti 229 volumi mentre per ogni run di imitazione sono stati acquisiti 211 volumi.

In aggiunta alle immagini funzionali, è stato acquisito un volume morfologico 3D ad alta risoluzione spaziale (3D BRAVO MIK) (GE Healthcare), con i seguenti parametri: section thickness, 0.9 mm; TR/TE, 12.36/5.18 ms; flip angle, 13°.

3.5 Valutazione video-based dei dati comportamentali acquisiti durante la sessione di risonanza magnetica

Per valutare da un punto di vista comportamentale l'efficienza della performance imitativa dei partecipanti è stata eseguita un'analisi *video-based*. Per la specifica analisi dei video è stata usata l'applicazione Final Cut-Pro, un software di editing e visualizzazione. L'esperimento comprendeva 2 RUN, composte ciascuna da 8 sequenze in cui il partecipante era istruito prima ad osservare il modello e - solo successivamente all'istruzione indicata dal cerchio verde - ad imitare. Quindi, sono stati analizzati 56 video di circa 7 minuti ciascuno, di cui venivano esaminate diverse e specifiche variabili, quali:

1. *Tempo di esecuzione*, ossia il tempo impiegato dal soggetto per eseguire l'intera sequenza;
2. *Delay*, ossia il tempo impiegato dal soggetto dal momento in cui afferra il foglio alla realizzazione del primo *step*, ovvero ogni singolo passaggio;
3. *Utilizzo della mano destra*, per eseguire i passaggi e le pieghe;
4. *Utilizzo della mano sinistra*, per eseguire i passaggi e le pieghe;
5. *Utilizzo delle due mani*, per eseguire i passaggi e le pieghe;
6. *Numero di pieghe* effettuate nell'intera procedura;
7. *Numero di pieghe corrette*, ossia il numero di pieghe eseguite correttamente dal soggetto se confrontate con quelle eseguite dall'attore in quella specifica sequenza;
8. *Numero di passaggi corretti*, ossia il numero di passaggi eseguiti correttamente dal soggetto se confrontati con quelli eseguiti dall'attore in quella specifica sequenza;
9. *Rotazioni*, ossia la rotazione del foglio di almeno 90°.

Analisi video-based del modello: scoring dell'attore

Alcune variabili sono state analizzate prima nei video-modello, in cui venivano riprese le mani dell'attore eseguire l'origami. Ciò avrebbe permesso successivamente di considerare tali valori grezzi come punteggi di confronto con la performance dei partecipanti dello studio. Sono stati analizzati i video di 8 sequenze di una durata di 16 secondi ciascuna. Lo scoring per ciascuna variabile è stato riportato su un foglio Excel ai fini di creare una tabella riassuntiva dei punteggi grezzi ottenuti dall'attore.

La valutazione della performance del modello esclude le variabili che indicano il numero di pieghe corrette e il numero di passaggi corretti in quanto equivale sempre al 100% di accuratezza nell'attore, ed è difatti il punto di confronto per valutare la performance imitativa nei soggetti sperimentali.

I passaggi sono stati intesi in questo studio in termini di *step* eseguiti dall'attore da una parte all'altra del foglio, che poteva essere, ad esempio, da sinistra a destra, da sopra a sotto, e viceversa.

Le pieghe, invece, sono state considerate in termini di piegature del foglio, che, anche in questo caso, potevano avvenire in diversi punti, in base al tipo di configurazione finale che si intendeva ottenere nella sequenza (Figure 11 e 12).

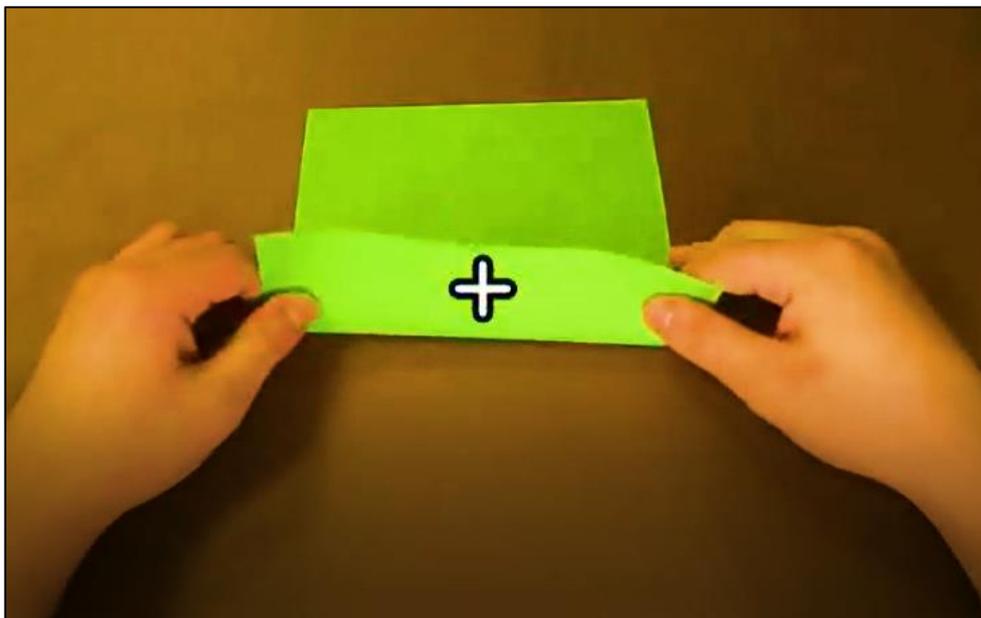


Figura 11: Esempio di variabile "passaggio": in questo caso, l'attore sta eseguendo un passaggio dalla parte inferiore del foglio alla parte superiore.

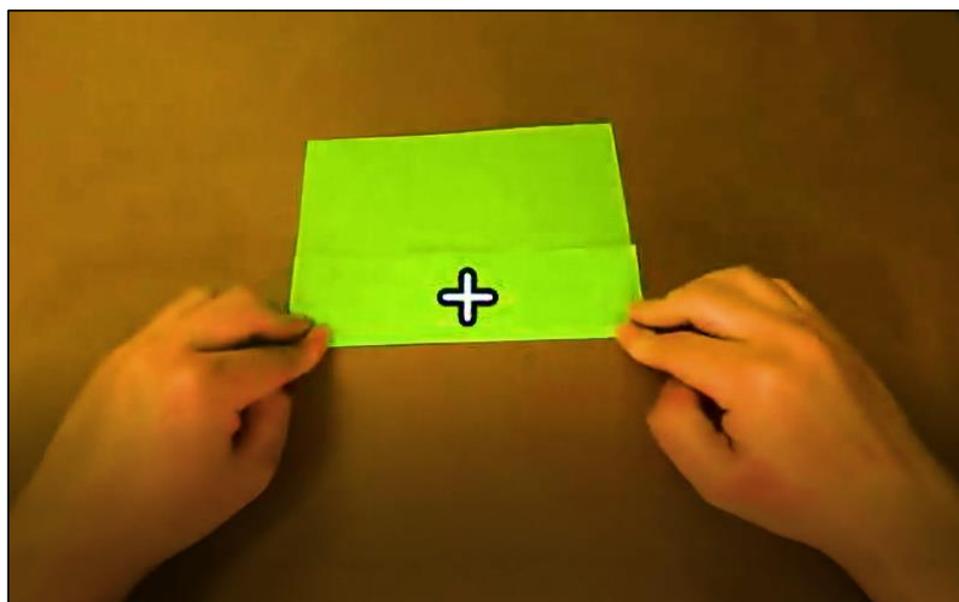


Figura 12: Esempio di variabile "piega": il soggetto sta eseguendo la piegatura del foglio nella sua parte inferiore.

Il tempo di esecuzione comprendeva:

1. Il tempo impiegato dall'attore da quando aveva le mani ferme al primo *afferramento* (*grasping*) del foglio (tempo di inizio);

2. Il tempo impiegato dall'attore dal *grasping* al primo step;
3. Il tempo finale in cui l'attore effettua l'ultima piegatura del foglio (tempo di fine).

Il tempo di esecuzione delle azioni dei soggetti è stato calcolato sottraendo il tempo finale da quello iniziale, risultando in un tempo di esecuzione effettivo impiegato dall'attore per eseguire l'intera sequenza.

Il Delay, invece, è stato calcolato come il tempo (in millisecondi) trascorso dall'afferramento del foglio all'esecuzione del primo passaggio.

Per ciascuna sequenza è stato inoltre calcolato il numero di volte in cui l'attore utilizzava la mano sinistra, destra o entrambe le mani per eseguire i diversi passaggi e le diverse pieghe. Dunque, se l'attore eseguiva un passaggio da sinistra a destra con la mano sinistra, in quel caso è stato assegnato un punto alla variabile mano sinistra. Tale calcolo è stato preso in riferimento per l'intera sequenza e per tutte le variabili, e poi sono stati sommati i punteggi ottenuti.

Di seguito è riportato un esempio di scoring dell'attore.

ATTORE_TEMPO	ATTORE_MANO DX	ATTORE_MANO SX	ATTORE_2 MANI	ATTORE_PIEGA	ATTORE_PASSAGGI	ATTORE_ROTAZIONI
12,69	0	2	4	3	3	0
12,74	1	4	1	3	3	1
12,68	4	3	0	3	3	0
13,32	3	2	1	3	3	0
12	4	2	0	3	3	0
12,62	1	4	1	3	3	0
12,42	2	4	0	3	3	0
13,48	2	3	1	3	3	0
12,7	3	2	1	3	3	0
13,04	4	2	0	3	3	1
12	2	4	0	3	3	0
12,64	2	4	0	3	3	0
13,6	1	4	1	3	3	0
12,62	0	4	2	3	3	0
11,98	0	4	2	3	3	0
12	4	2	0	3	3	0

Figura 13: Esempio di scoring comportamentale ottenuto dall'attore durante le 8 sequenze delle due RUN del compito fMRI. I numeri della prima colonna ("ATTORE_TEMPO") corrispondono ai secondi impiegati dall'attore per eseguire l'intera sequenza.

Come possibile notare dalla Figura 13, nella prima sequenza l'attore utilizza 0 volte la mano destra, 2 volte la mano sinistra, 4 volte le due mani per eseguire i passaggi e le pieghe del foglio. Poiché i passaggi e le pieghe sono rispettivamente 3, l'attore ha utilizzato sempre 6 volte le mani per eseguire la procedura, ma in ogni sequenza questa somma variava in termini qualitativi: l'attore poteva utilizzare più volte la mano sinistra, mentre in altre più volte la mano destra, e in altre ancora le due mani. Ne consegue che il numero di pieghe e il numero di passaggi eseguiti dall'attore è sempre equivalente a 3 per tutte le sequenze, come riportato in immagine.

Analisi video-based: scoring dei partecipanti

Per quanto riguarda l'analisi dei video dell'azione eseguita dai partecipanti, sono state prese in considerazione le registrazioni ottenute in risonanza, le quali riprendevano solo le mani dei soggetti nello scanner invitati ad eseguire il compito. Nello specifico, le riprese sono state effettuate mediante una video-camera Go-Pro, posizionata dietro lo schermo di

risonanza: in questo modo, la visuale ottenuta corrispondeva all'immagine dello scanner in primo piano, accompagnate dalla presenza delle mani che manipolano il foglio. Come per l'attore, anche per la valutazione comportamentale dei soggetti sperimentali sono state considerate sia le variabili "Tempo di esecuzione", sia le variabili "qualitative" in termini di mani utilizzate per eseguire la procedura (vedi anche descrizione seguente). I punteggi sono stati riportati su un foglio Excel individuale per ciascun soggetto: dunque, sono stati elaborati 28 fogli Excel, ciascuno contenente la tabella riassuntiva dello scoring del soggetto, riconoscibile grazie all'etichetta "ALZ" con cui i partecipanti erano stati contrassegnati.

Nel caso del Tempo di Esecuzione, esso veniva calcolato sottraendo dal tempo finale in cui l'individuo terminava il movimento (corrispondente anche al momento in cui veniva ritirato il foglio da parte dello sperimentatore) il tempo iniziale (corrispondente al momento in cui l'individuo afferrava il foglio per poi iniziare la procedura).

Il Delay, invece, corrispondeva alla sottrazione tra il tempo del primo step eseguito e il tempo iniziale in cui afferrava il foglio dalle mani dello sperimentatore.

Anche nel caso dei partecipanti, come per l'attore, sono stati riportati i punteggi delle variabili qualitative, ossia il numero di volte in cui è stata utilizzata la mano destra, sinistra o le due mani nell'intera sequenza.

Di seguito, un esempio dello scoring comportamentale ottenuto da un partecipante dello studio (Fig. 14):

SEQUENZA	TEMPO	DELAY	MANO DX	MANO SX	2 MANI	N. PIEGHE	N. PIEGHE CORR.	N. PASS.	N. PASS. CORR.	ROTAZIONI
IMI 1	16	1,5	0	0	1	0	0	1	1	1
IMI 2	16	0,21	1	3	2	3	2	3	2	0
IMI 3	16	1,16	3	1	1	2	2	3	3	0
IMI 4	15,6	0,21	1	2	2	1	1	4	3	1
IMI 5	16	2,2	1	2	2	2	2	3	3	0
IMI 6	14,6	1,44	1	0	4	1	1	4	3	0
IMI 7	16	1,5	1	2	1	2	2	2	2	0
IMI 8	16	1,55	1	2	3	3	3	3	3	0
IMI 9	16	2,37	3	1	1	2	1	3	1	0
IMI 10	11,48	0,9	2	1	2	2	1	3	3	0
IMI 11	13,92	0,74	2	0	3	2	2	3	2	0
IMI 12	16	0,37	1	2	2	2	1	3	3	0
IMI 13	16	2,94	0	3	3	2	1	4	3	0
IMI 14	16	2,05	0	3	2	2	2	3	3	0
IMI 15	16	2,32	1	2	2	2	2	3	3	0
IMI 16	15,72	0,21	3	2	1	3	3	3	3	0

Figura 14: *Punteggi grezzi ottenuti da un soggetto sperimentale (sano) durante le diverse sequenze. I numeri della seconda colonna rappresentano i secondi impiegati dal partecipante per eseguire la sequenza.*

A differenza dell'attore, per lo scoring dei partecipanti sono state considerate altre due variabili importanti, corrispondenti ai passaggi e alle pieghe corrette (Fig. 14; variabili evidenziate in blu). Esse corrispondono agli *step* e alle piegature del foglio che sono state eseguite in modo analogo a quelli eseguiti dall'attore. Per poter effettuare questo tipo di analisi, i passaggi eseguiti dai partecipanti venivano confrontati con i passaggi eseguiti dall'attore nelle diverse sequenze, e lo stesso dicasi per il numero di pieghe corrette. Per ciascuna sequenza eseguita dall'attore, infatti, sono stati annotati i tipi di passaggi e di pieghe eseguiti, che poi avrebbero dato origine alla configurazione finale dell'origami: l'attore avrebbe potuto, ad esempio, eseguire un passaggio da sopra a sotto con conseguente piegatura della parte superiore del foglio, per poi fare un passaggio da sinistra a destra con piegatura a sinistra, e un passaggio da destra a sinistra con piegatura a destra. Così valutati, i passaggi e le pieghe sono stati poi confrontati con quelli eseguiti dal partecipante, che solo nel caso in cui avesse eseguito le pieghe e i passaggi in modo

totalmente corrispondente all'attore, avrebbe ottenuto un punteggio corrispondente a 3 su 3 (3 pieghe o passaggi corretti su 3).

Viceversa, nel caso in cui nell'intera sequenza il partecipante avesse svolto in modo scorretto i passaggi o le pieghe, allora il punteggio sarebbe stato penalizzato e sarebbero state riportate solo le procedure eseguite in modo corretto (ad esempio, 2 su 3).

Passaggi e pieghe sono le variabili prese maggiormente in considerazione in questo studio, volto ad indagare la capacità imitativa nel campione preso in analisi. Poiché l'imitazione richiede sia una particolare attenzione ai passaggi e alle pieghe eseguite dall'attore, che avrebbe poi determinato la configurazione finale dell'origami, sia un'analisi del *modo* in cui l'attore esegue queste diverse procedure, e dunque dei movimenti specifici utilizzati, sono state considerate due diversi tipi di performance nel partecipante: una in termini quantitativi e una in termini qualitativi.

La *Performance Qualitativa* fa riferimento alla capacità di imitare l'azione con gli stessi movimenti eseguiti dall'attore: dunque, l'effettiva accuratezza del tipo di mano usata dal soggetto se confrontata con quella utilizzata dall'attore per eseguire i diversi passaggi e le diverse pieghe del foglio.

D'altra parte, la *Performance Quantitativa* fa riferimento alla percentuale di passaggi e di pieghe corrispondenti a quelle eseguite dall'attore, indipendentemente dai movimenti con cui esegue tale procedura. Ad esempio, per eseguire i passaggi e le pieghe in modo corrispondente all'attore, il soggetto avrebbe potuto usare le mani in modo diverso dall'attore stesso, svolgendo un passaggio da destra a sinistra con le due mani, piuttosto che un passaggio da destra a sinistra con la mano destra, come invece eseguito dall'attore.

In questo studio è stata dunque distinta l'imitazione in termini di riproduzione del *goal* della sequenza, e dunque di passaggi e di pieghe corrispondenti a quelle del modello per ottenere la configurazione finale dell'origami, dall'imitazione in termini di riproduzione dei

movimenti corrispondenti a quelli svolti dall'attore per l'esecuzione del compito motorio (ad esempio, esecuzione del primo passaggio con la mano destra, ecc.).

Difatti, è bene ricordare che questo studio ha come obiettivo quello di valutare la capacità imitativa nei pazienti con AD lieve o MCI, e dunque il tentativo maggiore è stato quello di presentare le istruzioni nel modo più semplice possibile ai pazienti, così da rendere il compito più adatto alla loro patologia, evitando un sovraccarico cognitivo che avrebbe messo in difficoltà il paziente. Ai partecipanti, infatti, è stato richiesto di osservare il video dell'attore e successivamente di imitare semplicemente ciò che faceva.

In termini di scoring, la performance quantitativa è stata calcolata in questo modo: è stata prima considerata una variabile definita "Performance totale", in cui sono state inizialmente sommate le pieghe e i passaggi corretti di ciascun soggetto in ogni sequenza, e dopo è stata calcolata la media dei dati grezzi. Successivamente, è stato svolto un confronto tra la performance dell'attore, che è sempre pari a 6 per sequenza (in quanto equivalente a 3 passaggi + 3 pieghe), e quella del singolo soggetto. Il risultato ottenuto è stato riportato in valori percentuali che corrispondono alla performance quantitativa del soggetto durante il compito di imitazione.

La performance qualitativa, invece, è stata calcolata confrontando il numero di volte in cui l'attore utilizzava la mano destra, la mano sinistra, le due mani, il numero di passaggi e il numero di pieghe totali eseguite nelle diverse sequenze, e le rotazioni, con le stesse variabili calcolate nella performance del soggetto. Anche la variabile Performance Qualitativa è stata riportata in valori percentuali, rispetto alla performance dell'attore.

Riguardo ai movimenti non richiesti, ovvero le pieghe o i passaggi aggiuntivi che il soggetto eseguiva nelle diverse sequenze, questi sono stati riportati in una variabile ulteriore, definita "Movimenti Aggiuntivi". Essa è stata calcolata tramite la semplice somma dei punteggi grezzi ottenuti in questa variabile: in tal modo, il soggetto avrebbe ottenuto un

unico punteggio corrispondente agli *step* o alle pieghe in più rispetto a quelle che avrebbe dovuto svolgere seguendo il modello.

Infine, un'altra variabile considerata in questo studio è stata denominata "DIFFERENZA TEMPO", e corrisponde alla differenza di tempo impiegato dal partecipante per eseguire il compito rispetto al tempo di esecuzione dell'attore.

Dopo aver riportato su un foglio Excel i punteggi grezzi delle diverse variabili prese in analisi, e le variabili di confronto sopra descritte, questi ultimi valori sono stati trascritti su un *database* finale, in cui sono stati inseriti in colonna prima i pazienti MCI, poi i pazienti AD e infine in controlli, con i rispettivi punteggi in PERFORMANCE QUANTITATIVA, PERFORMANCE QUALITATIVA, DIFFERENZA TEMPO, MOVIMENTI AGGIUNTIVI, calcolate nel modo precedentemente descritto. Su quest'ultimo database è stato possibile lavorare ulteriormente, andando a definire le possibili differenze tra i pazienti AD e i controlli rispetto al compito richiesto.

3.6 Analisi statistiche dei dati comportamentali e fMRI

Per quel che concerne le analisi statistiche dei dati comportamentali, per poter indagare le differenze tra i due gruppi sono state confrontate le medie di ciascuna variabile di confronto tra partecipante e attore, quali PERFORMANCE QUANTITATIVA, PERFORMANCE QUALITATIVA, DIFFERENZA TEMPO e MOVIMENTI AGGIUNTIVI. Data la bassa numerosità campionaria, per ciascuna variabile presa in analisi è stato applicato il Test robusto U di Wilcoxon-Mann-Whitney, tramite l'utilizzo del software statistico R studio.

I dati fMRI sono stati analizzati utilizzando un random-effects model (Penny e Holmes, 2007) e una procedura a due livelli. Nel primo livello di analisi, le risposte fMRI di ciascun soggetto sono state modellizzate usando il Modello Lineare Generale (GLM) in una matrice

che comprendeva l'inizio (in secondi) dei blocchi sperimentali (onset) e le rispettive durate per ogni condizione. Il modello GLM includeva 4 regressori: OBS FOLD, OBS REACH, OBS TO IMI, IMI.

Pre-processing dei dati fMRI

I dati fMRI possono richiedere tecniche di pre-elaborazione per garantire un'analisi accurata, efficiente o significativa. In questo studio le analisi di preprocessing delle immagini funzionali, sia del gruppo di controllo sia del gruppo dei pazienti, sono state eseguite mediante il software SPM12 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College, London, UK) operante su piattaforma MATLAB R2015b (The Mathworks, Inc., Natick, MA). Per ciascun soggetto, i voxel sono stati corretti implementando le principali tecniche di correzione, quali: riallineamento spaziale, slice-timing correction (correzione del tempo di ripetizione\acquisizione), co-registrazione anatomico-funzionale, normalizzazione al template del Montreal Neurological Institute (MNI) e lo smoothing spaziale (8mm), utile per rimuovere il rumore e per limitare l'effetto delle differenze individuali nelle analisi di gruppo.

Per le analisi statistiche di secondo livello (analisi di gruppo), sono stati calcolati gli effetti principali delle condizioni sperimentali vs baseline. Le immagini di primo livello di ogni partecipante, ovvero ciascun contrasto vs baseline, sono state inserite in un'ANOVA per misure ripetute (Friston et al., 1995). Tale processo è stato applicato in 2 GLM differenti, uno per ciascun gruppo, pazienti e controlli. Per evidenziare le attivazioni condivise, è stata effettuata una *conjunction analysis* fra le condizioni OBS TO IMI & IMI. Inoltre, è stato calcolato il contrasto tra le condizioni sperimentali OBS FOLD vs OBS REACH; e tra le condizioni OBS IMI vs OBS FOLD, per pazienti e controlli. Per valutare la significatività delle differenze del segnale BOLD nei contrasti tra le condizioni è stato applicato il test *t* di Student.

Infine, per verificare l'esistenza di una relazione lineare tra le attivazioni fMRI ottenute dai partecipanti sani nella condizione OBS TO IMI e i dati comportamentali relativi alla performance è stata eseguita una regressione *whole-brain* su SPM12. Dai risultati di questa analisi è stata selezionata una regione di interesse, corrispondente alla DLPFC, che è stata successivamente usata per verificare l'esistenza di una relazione simile tra attivazione BOLD e performance comportamentale nei pazienti Alzheimer. Per analizzare il segnale all'interno della DLPFC è stato utilizzato il software REX per SPM. Inoltre, per l'analisi di regressione è stato utilizzato anche il pacchetto R.

4. RISULTATI

4.1 Risultati della valutazione neuropsicologica

In questo paragrafo vengono discussi i risultati relativi ai test neuropsicologici somministrati al gruppo di controllo e al gruppo di pazienti per lo studio fMRI. Il gruppo di controllo ha riportato, allo screening neuropsicologico (MMSE), un punteggio grezzo medio di 28.3 con deviazione standard 1.1.

Nella tabella sottostante (Tab. 1) vengono riportati i punteggi grezzi dei pazienti ai test neuropsicologici.

Test	MCI 1	MCI 2	MCI 3	AD 1	AD 2	AD 3	AD 4
ADL	6	6	6	4	6	6	
IADL	5	5	8	4	7	5	
MMSE	27	25	27	24	20	27	22
DIGIT_SPAN_FORWARD	6	5	7	6	4	6	5
DIGIT_SPAN_BACKWARD	5	5	5	2	3	4	4
CORSI_FORWARD	4	2	3	0	0	0	3
CORSI_BACKWARD	4	4	3	0	0	2	1
FCSRT_IFR	22	14	20	23		24	15
FCSRT_ISC	1	0,63	0,75	0,92		1	0,95
FCSRT_DFR	0	3	6	6		10	4
FCSRT_ITR	36	28	11	35		12	35
FCSRT_INTRUSIONI	1	5	5	0		0	2
REY_COPIA_DIFFERITA	25	0	13	1	0		0
FLUENZE FONEMICHE	27	27	21	30	28	27	9
FLUENZE SEMANTICHE	35	34	37	19		21	22
SAND	14	13	13	13		12,5	14
DENOMINAZIONE_AZIONI	9,5	8,5	9,5	9	6	8,5	7,5
MFTC_ACCURATEZZA	0,96	0,96	1	0,607		1	1,33
MFTC_FALSI ALLARMI	0	0	0	11		0	1
MFTC_TEMPO	44	83	93	295		65	76
STROOP_ERRORI	0,5	0,5	0	0,5	29	0	3
STROOP_TEMPO	21	28	37	307	9	38	27,5
REY COPIA IMMEDIATA	33	32	33	5,5	24		34
OROLOGIO	4	3	4	0	0	0	0
CAMPANELLE_TEMPO	-16	38	35	436	38	33	220
CAMPANELLE_ASIMMETRIA	1	-2	0	4	-3	1	3
CAMPANELLE_OMISSIONI	1,5	2,58	0	10	3,25	7,58	8,37
EDINBURGH	0,65	1	0,45	1	1	0,5	0,5
APRASSIA	71	66	61	65	68	64	63

Tabella 1: *Punteggi grezzi dei singoli pazienti ai test neuropsicologici. I test evidenziati con lo stesso colore si riferiscono alla valutazione di uno stesso dominio cognitivo (Rosa = Autonomie, Verde = Memoria a breve termine, Arancione = Memoria Episodica, Celeste = Linguaggio, Giallo = Attenzione e le Funzioni esecutive, Grigio = Attenzione visuospatiale e prassia costruttiva, Blu = Preferenza Manuale, Rosso = Aprassia Ideomotora).*

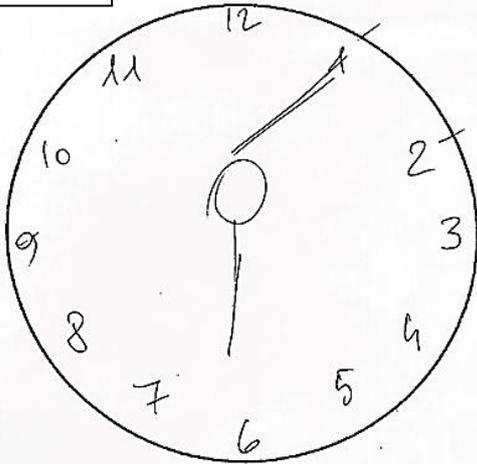
In linea generale, dalle valutazioni neuropsicologiche dei pazienti inclusi nello studio è emerso che:

1. Il paziente MCI1 ha ottenuto un punteggio ai limiti inferiori di normalità nella copia di materiale visuo-grafico complesso (test della Figura di Rey);

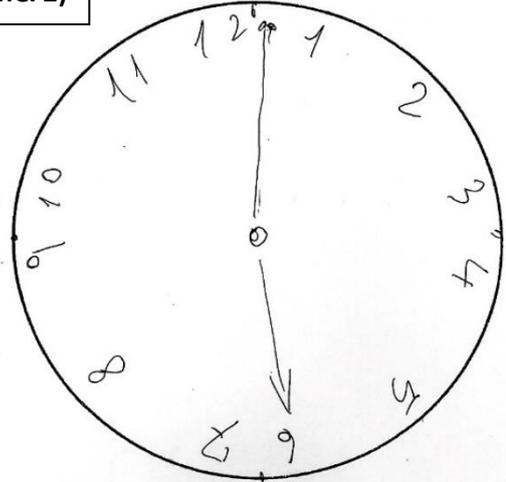
2. Nel paziente MCI2 la prestazione nella prova di apprendimento supra-span verbale (FCSRT), volta ad indagare l'efficienza della funzionalità mnesica, è risultata essere totalmente deficitaria, sia nella rievocazione immediata che in quella differita, così come la performance di rievocazione differita di materiale visuo-grafico complesso (Figura di Rey Differita). Inoltre, il punteggio al compito di denominazione su presentazione di materiale visivo (SAND) è risultato essere ai limiti inferiori di normalità.
3. Il paziente MCI3 mostra un punteggio deficitario nel Test di Corsi, sia forward che backward, con punteggi al test FCRST nei limiti, così come per lo Stroop Test nell'interferenza del tempo (>36).
4. Il paziente AD1 presenta una prestazione totalmente deficitaria sia nell'indagine della memoria a breve termine (Test di Corsi) che nei test costruttivi e visuo-spaziali (Test dell'Orologio, Test di Cancellazione delle Campanelle).
5. Il paziente AD2 presenta una prestazione totalmente deficitaria sia nell'indagine della memoria a breve termine (Test di Corsi) che nel test visuo-spaziale dell'Orologio. Inoltre, la paziente ha riportato un punteggio ai limiti inferiori di normalità nel Test di Cancellazione delle Campanelle e presenta un punteggio patologico al MMSE = 20 (<23).
6. Il paziente AD3 presenta valori deficitari nel Test della memoria a breve termine di Corsi, backward e forward, nel test FCRST e nel Test che indaga le funzioni linguistiche, in particolare le fluenze semantiche. Il test di Stroop presenta punteggi nei limiti, al di sotto del cut-off per quanto riguarda l'interferenza tempo. Risulta deficitario anche il Test costruttivo e visuo-spaziale dell'Orologio.
7. Il paziente AD4 dimostra un punteggio patologico al Test che indaga l'alterazione delle funzioni cognitive MMSE (<23); al Test span di cifre backward, al Test di Corsi (forward e backward), al Test FCSRT, alla copia di Rey differita e infine ai Test costruttivi dell'Orologio e di Cancellazione delle Campanelle.

In figura 15 sono riportati i Test dell'Orologio elaborati e rappresentati dai pazienti. Come possibile notare, la performance dei pazienti MCI (A; B; C) risulta essere ai limiti superiori della norma (PE = 4) mentre è totalmente deficitaria la prestazione dei pazienti AD (D; E; F; G) (PE = 0).

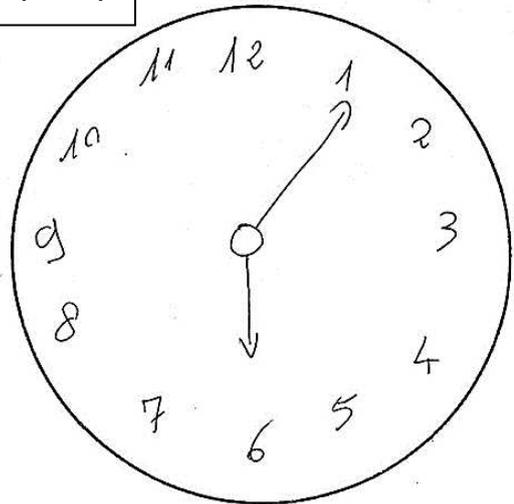
A (MCI 1)

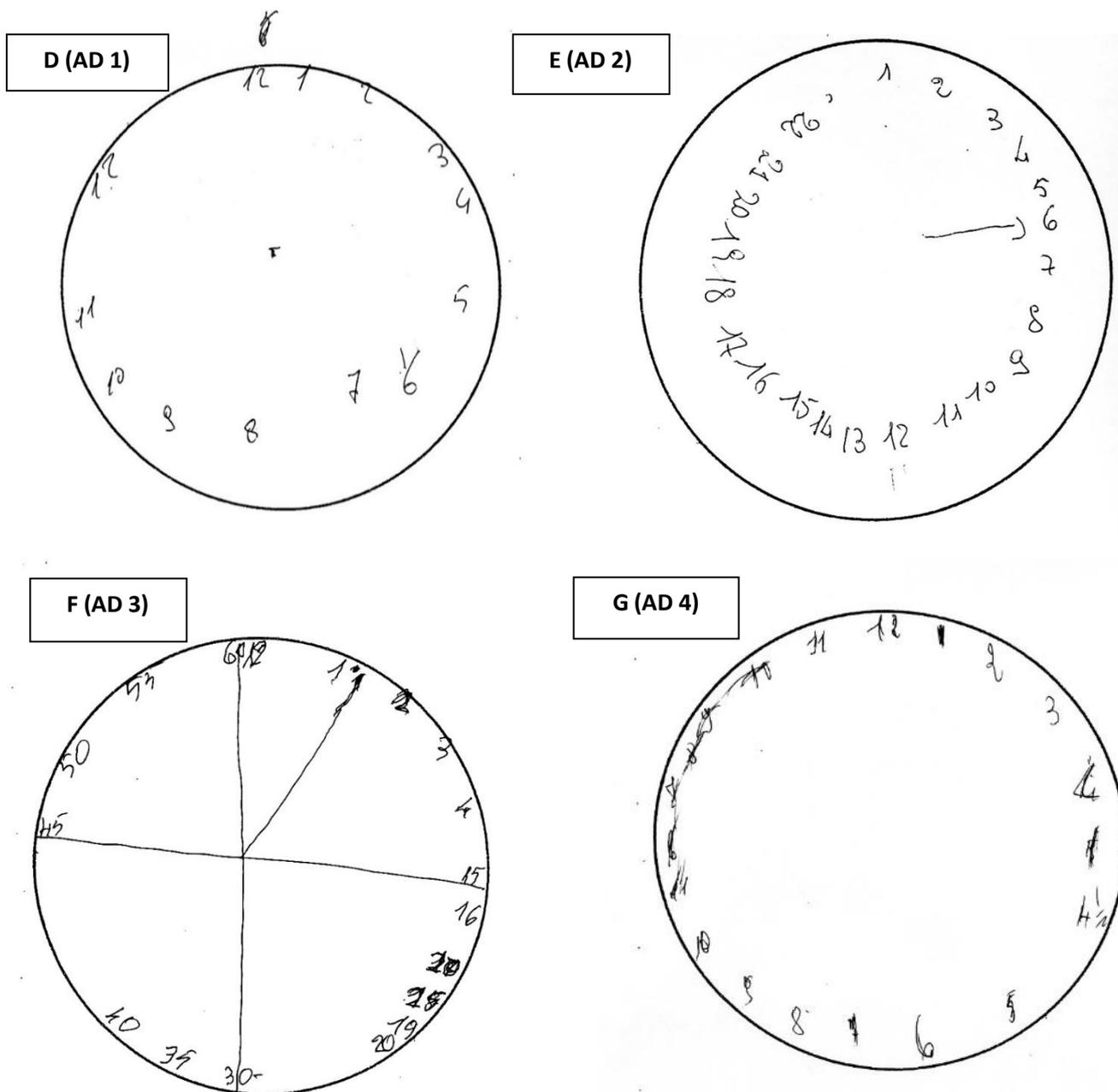


B (MCI 2)



C (MCI 3)





2

Figura 15: Esempi di Test dell'Orologio eseguiti dai pazienti MCI (A; B; C) e i pazienti AD (D; E; F; G)

In sintesi, alcuni pazienti MCI hanno presentato delle difficoltà nella copia di materiale visuo-grafico complesso (Figura di Rey; Figura di Rey differita) e altri un punteggio deficitario nei Test che indagano la memoria a breve termine, come il Test di Corsi, forward e backward. La maggior parte dei pazienti AD ha presentato punteggi deficitari nei Test costruttivi e visuo-spaziali, come il Test dell'Orologio, e nei Test che indagano la memoria

a breve termine (Test di Corsi). Due pazienti presentano punteggi patologici nei Test che indagano la funzione linguistica (fluenze semantiche) e nei Test che indagano la memoria episodica (FCRST).

4.2 Risultati dell'analisi comportamentale video-based

Per verificare la presenza di differenze significative tra gruppo di controllo e di pazienti in termini di funzionamento cognitivo generale, è stata calcolata la differenza tra i punteggi ottenuti al test MMSE.

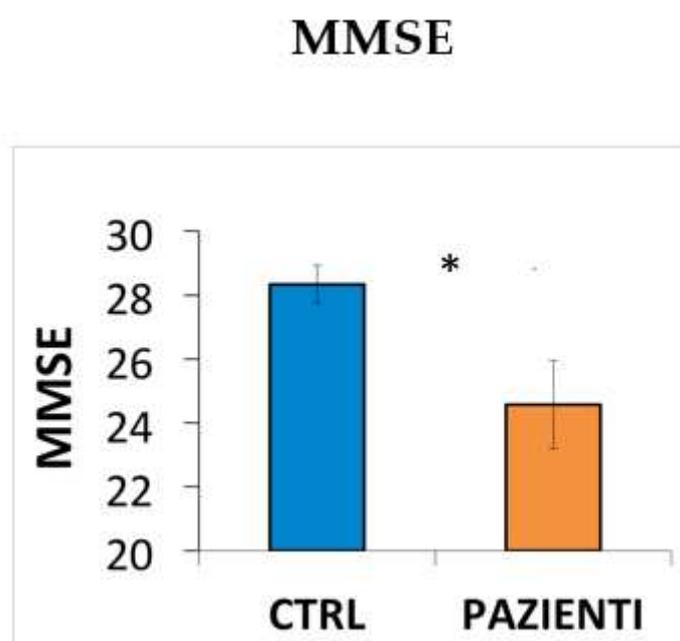


Figura16: Istogramma che mostra la differenza di punteggi al MMSE tra gruppo di controllo e gruppo di pazienti. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard. L'asterisco indica una differenza significativa con $p < 0.001$.

Come possibile notare a livello descrittivo dagli istogrammi, e come poi confermato successivamente dal test di Wilcoxon-Mann-Whitney, i due gruppi presentano punteggi significativamente diversi al MMSE. Nello specifico, il gruppo di controllo presenta un punteggio medio pari a 28 (DS= 0.8), mentre il gruppo di pazienti un punteggio medio pari a 25 (DS=1.38) ($U=6$ $p < 0.001$).

Nel caso della PERFORMANCE QUANTITATIVA, il gruppo di controllo presenta un punteggio medio pari al 65% (DS=18), mentre il gruppo dei pazienti pari al 44% (DS=20),

e tale differenza risulta significativa ($U=29$; $p=0,01$). I soggetti sani, dunque, presentano una performance quantitativa significativamente più alta rispetto al gruppo dei pazienti.

PERFORMANCE QUANTITATIVA

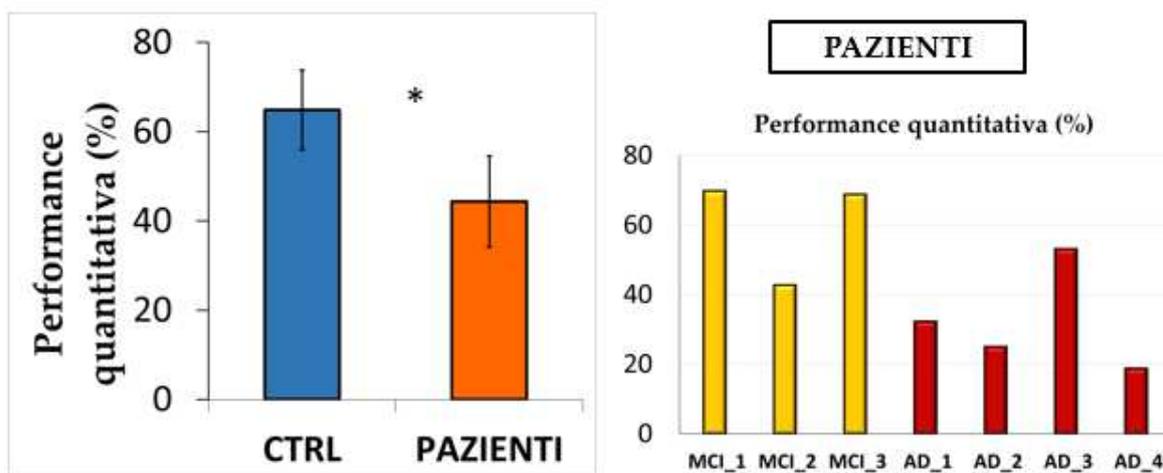


Figura 17: A sinistra, istogramma che mostra la differenza di punteggi nella variabile "Performance Quantitativa" tra gruppo di controllo e gruppo di pazienti. L'asterisco indica una differenza significativa con $p=0.01$. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard. A destra, istogrammi che mostrano la differenza di punteggi tra pazienti MCI e pazienti AD nella stessa variabile presa in analisi.

I risultati ottenuti sono stati maggiormente approfonditi mediante una visualizzazione dei dati ottenuti dai singoli pazienti. Nel complesso, dai risultati è emerso che i pazienti AD presentano punteggi medi più bassi rispetto ai pazienti MCI nelle variabili considerate, anche se questo dato non è sempre omogeneo. Tuttavia, la numerosità campionaria non consente ulteriori approfondimenti.

Considerando la variabile "PERFORMANCE QUANTITATIVA", i pazienti AD presentano punteggi più bassi rispetto ai pazienti MCI: nel complesso, i punteggi dei pazienti MCI nella performance si aggirano intorno al 70%, mentre quelli AD intorno al 55%. Tra questi, il paziente denominato "AD_4", presenta una performance quantitativa inferiore al 20%.

Tale analisi è stata maggiormente approfondita analizzando la correlazione tra il punteggio ottenuto nel test MMSE nei pazienti e l'andamento della performance quantitativa. I risultati ottenuti dimostrano una correlazione positiva significativa ($T = 0.82$; $p = 0.01$). Nello specifico, all'aumentare del punteggio in MMSE aumenta in percentuale la performance quantitativa dei pazienti.

PERFORMANCE QUANTITATIVA E MMSE NEL GRUPPO DI PAZIENTI

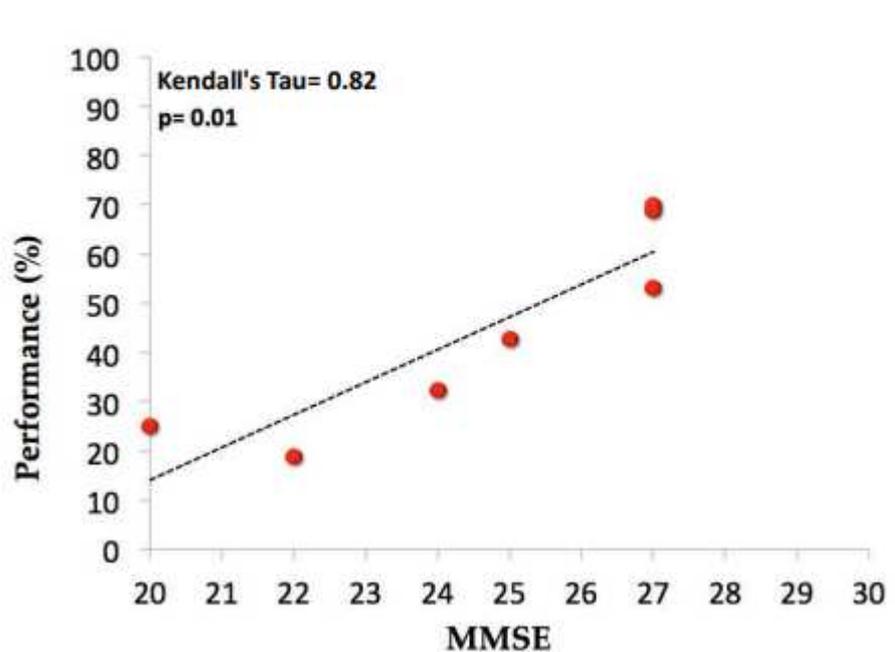


Figura 18: Correlazione tra la performance quantitativa e i punteggi ottenuti al MMSE nel gruppo di pazienti.

Per quanto riguarda la PERFORMANCE QUALITATIVA, i punteggi del gruppo di controllo e del gruppo di pazienti non risultano significativamente diversi ($p > 0.05$). I pazienti MCI sembrano presentare punteggi più alti rispetto ai pazienti AD in termini di accuratezza dei movimenti eseguiti per il compito di imitazione.

PERFORMANCE QUALITATIVA

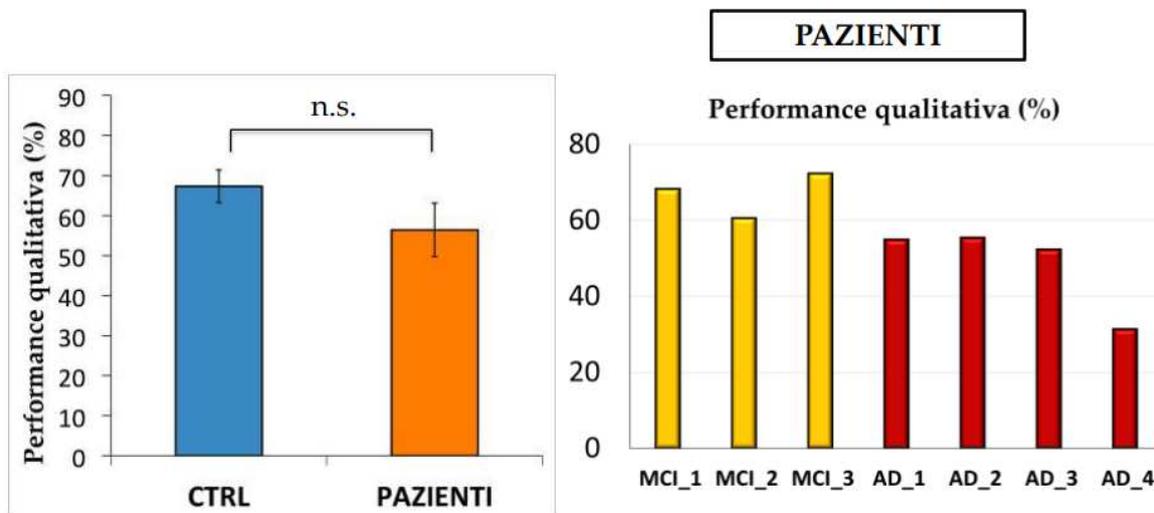


Figura 19: A sinistra, istogramma che mostra la differenza di punteggi nella variabile "Performance Qualitativa" tra gruppo di controllo e gruppo di pazienti. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard. A destra, istogrammi che mostrano la differenza di punteggi tra pazienti MCI e pazienti AD nella stessa variabile presa in analisi.

Dai dati ottenuti nella variabile DIFFERENZA TEMPO, il gruppo di controllo presenta un punteggio medio pari a 2 secondi, mentre i pazienti pari a 3 secondi, con DS= 1 nei controlli, e DS=0 nel gruppo dei pazienti. Il test U di Wilcoxon-Mann-Withney conferma che tale differenza è significativa ($U=111.5$; $p = 0.04$). I pazienti, quindi, hanno impiegato significativamente più tempo nell'eseguire il compito rispetto al gruppo di controllo, se confrontati con il tempo impiegato dall'attore. Tuttavia, anche se la numerosità campionaria non consente di effettuare ulteriori approfondimenti statistici, dall'analisi dei singoli pazienti emerge che i pazienti che impiegavano più tempo erano i pazienti AD, mentre, tendenzialmente, i pazienti MCI non avevano tempi di esecuzione così diversi rispetto al gruppo di controllo.

DIFFERENZA TEMPO

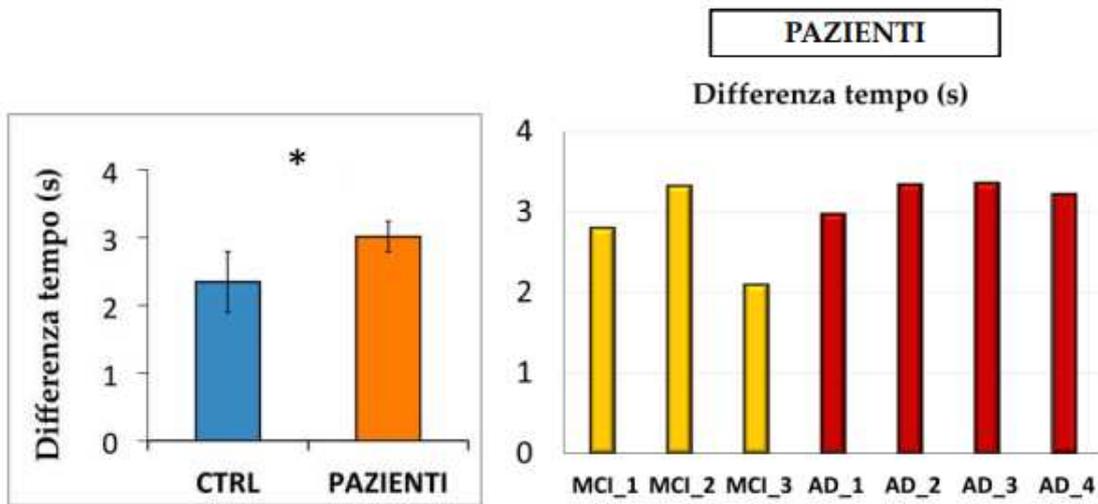


Figura 20 A sinistra, istogramma che mostra la differenza di punteggi nella variabile "Differenza Tempo" tra gruppo di controllo e gruppo di pazienti. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard. A destra, istogrammi che mostrano la differenza di punteggi tra pazienti MCI e pazienti AD nella stessa variabile presa in analisi.

Infine, per quanto riguarda la variabile MOVIMENTI AGGIUNTIVI, i controlli presentano una media di 28.14 e DS= 7.56, mentre i pazienti presentano un punteggio medio pari a 23.71 e DS= 9.55. Il test robusto U non ha identificato una differenza significativa tra i due gruppi ($U=60.5$; $p>0.5$). Nel caso dei pazienti MCI, in generale, il numero di movimenti aggiuntivi rientra nella media di quelli riscontrati nel gruppo di controllo; invece, per quanto riguarda i pazienti AD, i dati ottenuti sono contrastanti. Due pazienti presentano un alto numero di movimenti aggiuntivi (AD 1 e AD 2), mentre i restanti presentano un numero basso (AD 3 e AD 4).

MOVIMENTI AGGIUNTIVI

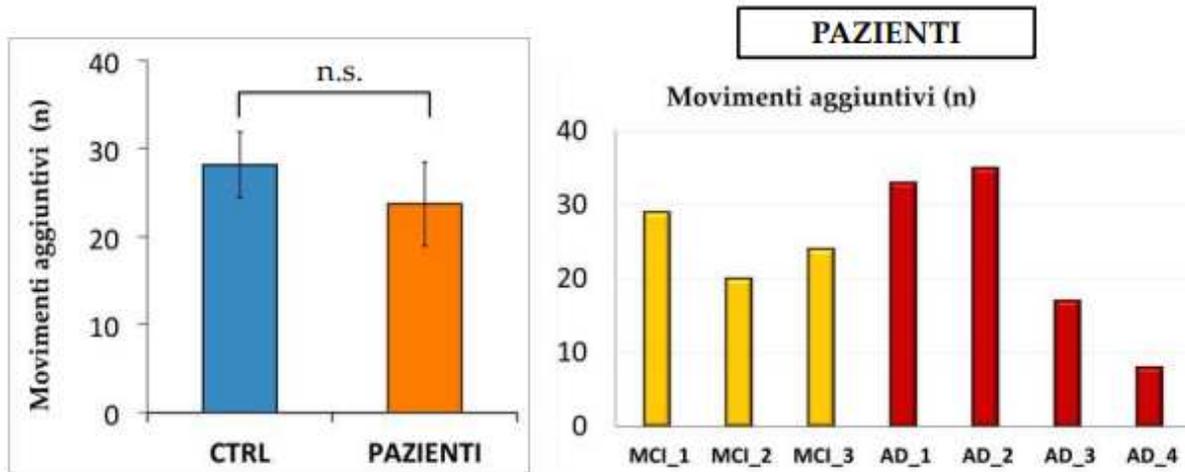


Figura 21 A sinistra, istogramma che mostra la differenza di punteggi nella variabile "Movimenti Aggiuntivi" tra gruppo di controllo e gruppo di pazienti. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard. A destra, istogrammi che mostrano la differenza di punteggi tra pazienti MCI e pazienti AD nella stessa variabile presa in analisi.

4.3 Risultati fMRI

I risultati fMRI derivanti dall'analisi di secondo livello sono riportati nelle figure da 22 a 30. Ciascuna delle condizioni sperimentali è stata confrontata con la fase di riposo (rest) e le attivazioni sono state corrette per confronti multipli. I confronti tra pazienti e controlli saranno di seguito riferiti alla distribuzione dell'attivazione in termini di presenza/assenza di aree attivate e di estensione dei cluster, più che in termini di intensità dell'attivazione.

4.3.1 Osservazione di azioni: risultati

Le attivazioni cerebrali ottenute dalla condizione di osservazione passiva delle mani dell'attore che manipolano il foglio (OBS FOLD), coinvolgono nel gruppo di controllo bilateralmente la corteccia premotoria dorsale e ventrale, la corteccia parietale posteriore, e la corteccia visiva occipito-temporale. Nel gruppo dei pazienti si riscontrano attivazioni comparabili a quelle dei controlli in termini di estensione dei cluster nell'emisfero di destra, incluse le regioni occipitali, parietali e premotorie. In tale condizione la corteccia premotoria ventrale e il lobulo parietale inferiore dell'emisfero sinistro sembrano meno attivati.

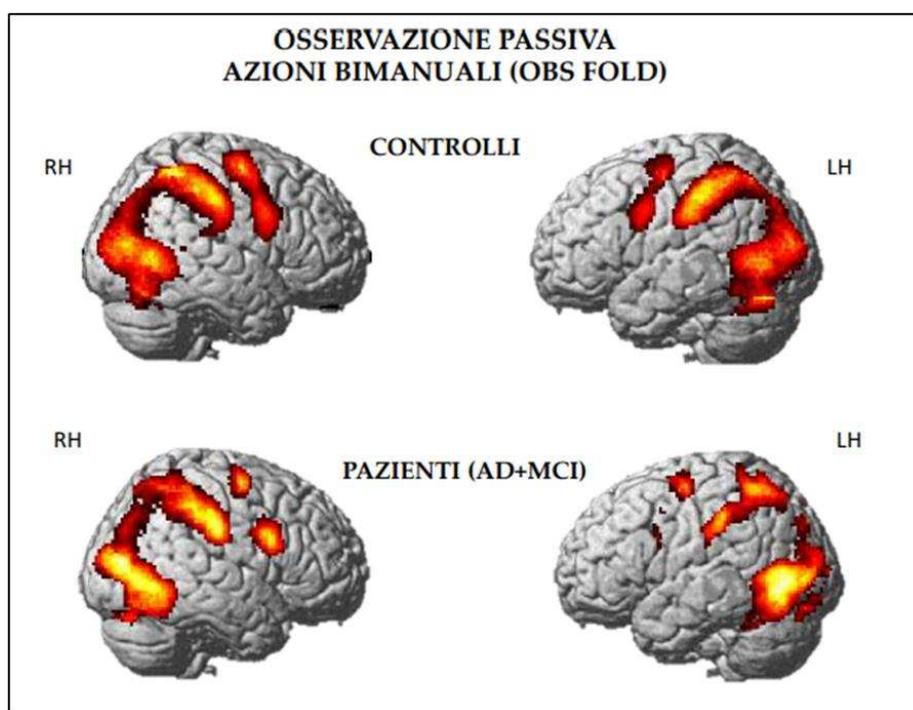


Figura 22: Attivazioni cerebrali ottenute dalla condizione di controllo OBS FOLD nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro

La condizione di controllo, costituita dall'osservazione di mani che ripetutamente raggiungono, toccano il foglio e tornano in posizione di partenza (OBS REACH), determina nel gruppo di controllo un'attivazione bilaterale della corteccia occipito-temporale. Nell'emisfero di destra tale condizione attiva anche la corteccia parietale posteriore, e parzialmente la corteccia premotoria dorsale.

Nel gruppo di pazienti emerge bilateralmente una attivazione della corteccia occipito-temporale e della corteccia parietale posteriore, anche se meno estesa rispetto ai controlli.

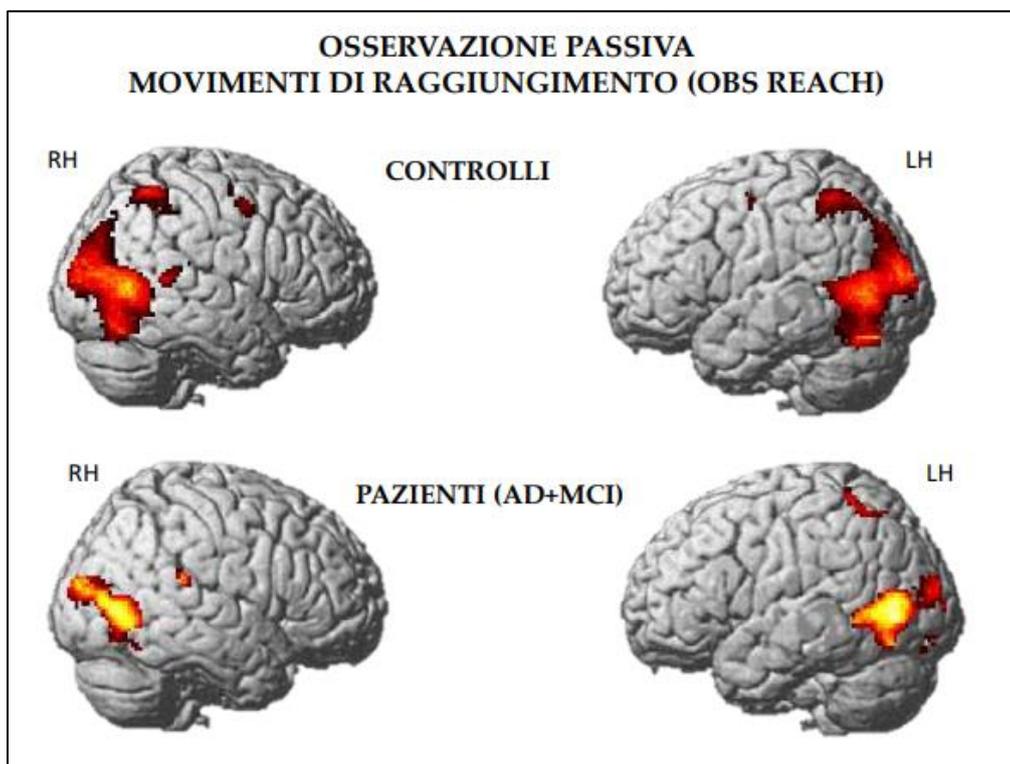


Figura 23: Attivazioni cerebrali ottenute dalla condizione di controllo OBS REACH nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

La condizione in cui il partecipante doveva osservare per imitare (OBS TO IMI), determina nel gruppo di controllo un'attivazione bilaterale della corteccia occipito-temporale, delle regioni parieto-premotorie, della corteccia prefrontale (PFC), e della corteccia somatosensoriale primaria (S1). Nel gruppo di pazienti è presente un'attivazione

bilaterale paragonabile dello stesso pattern parieto-premotorio, anche se leggermente più esteso a livello prefrontale. In tale condizione sembra emergere una minore attivazione della corteccia somatosensoriale nell'emisfero sinistro. Inoltre, l'attivazione della corteccia parietale inferiore nei pazienti risulta meno estesa.

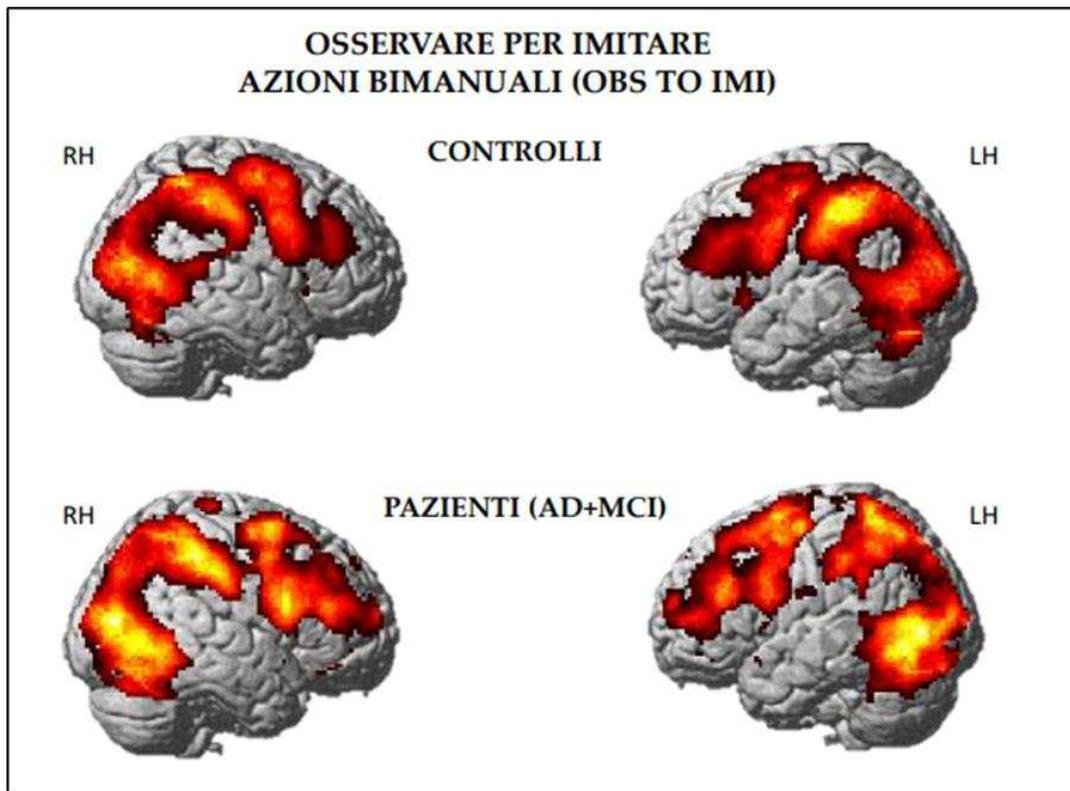


Figura 24: Attivazioni cerebrali ottenute dalla condizione OBS TO IMI nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

Tra i risultati fMRI, sono riportati anche due esempi rappresentativi di attivazioni singole ottenute dalla condizione OBS TO IMI da un paziente MCI ("MCI 03") confrontate con quelle di un paziente AD ("AD 04") (stesso livello di correzione statistica, $p=0.05$). Come è possibile notare dalla Figura 29, nel paziente MCI è presente un pattern molto più esteso di attivazioni rispetto al paziente AD, e coinvolge la corteccia prefrontale, premotoria, parietale, occipitale, e temporale, oltre che del cervelletto.

Nel paziente AD 4 sono presenti piccoli cluster di attivazioni bilaterali della corteccia parietale superiore, della corteccia premotoria, e della corteccia temporale posteriore.

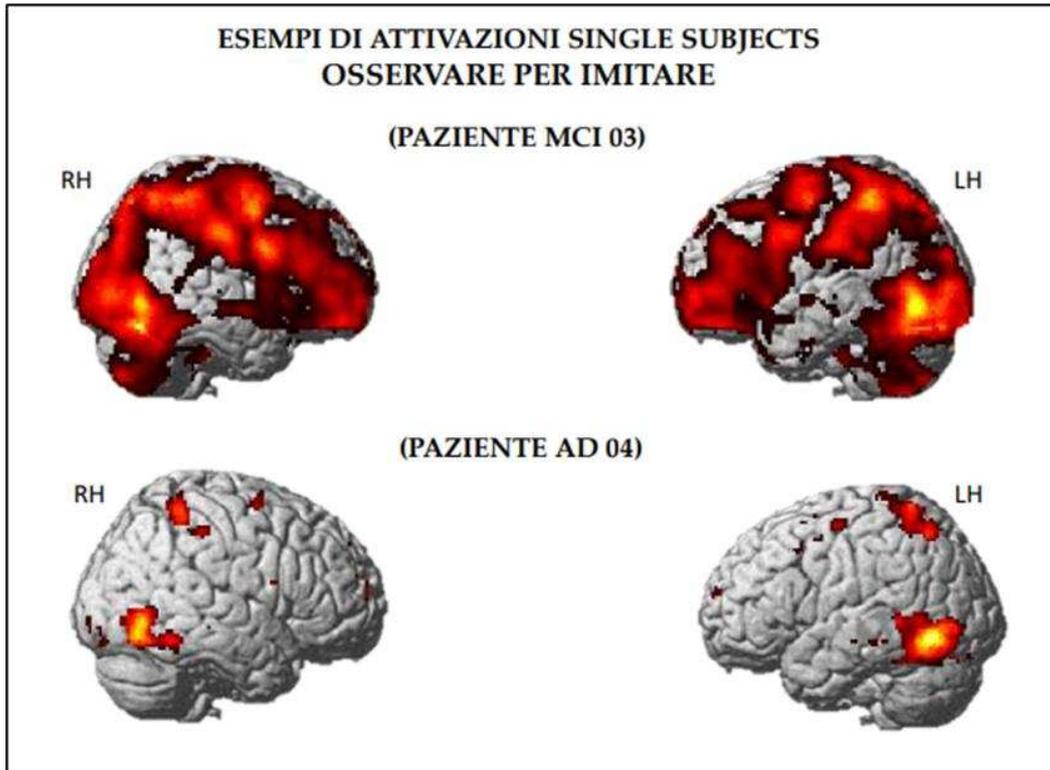


Figura 25: Attivazioni di singoli soggetti ottenute dalla condizione OBS TO IMI nel paziente MCI 03 e nel paziente AD 04.

4.3.2 Imitazioni di azioni: risultati

Nella condizione in cui il partecipante esegue l'imitazione (IMITATION), nel gruppo di controllo è presente bilateralmente un'attivazione delle aree sensorimotorie primarie, in particolare la corteccia motoria primaria (M1) e la S1, la corteccia premotoria ventrale e dorsale, e il giro frontale inferiore. Nel gruppo dei pazienti è presente un'attivazione paragonabile in M1 ed S1 e nella corteccia premotoria bilateralmente. Tuttavia, in tale condizione emerge nei pazienti l'attivazione della PFC nell'emisfero di sinistra, che non risulta essere presente nel gruppo di controllo.

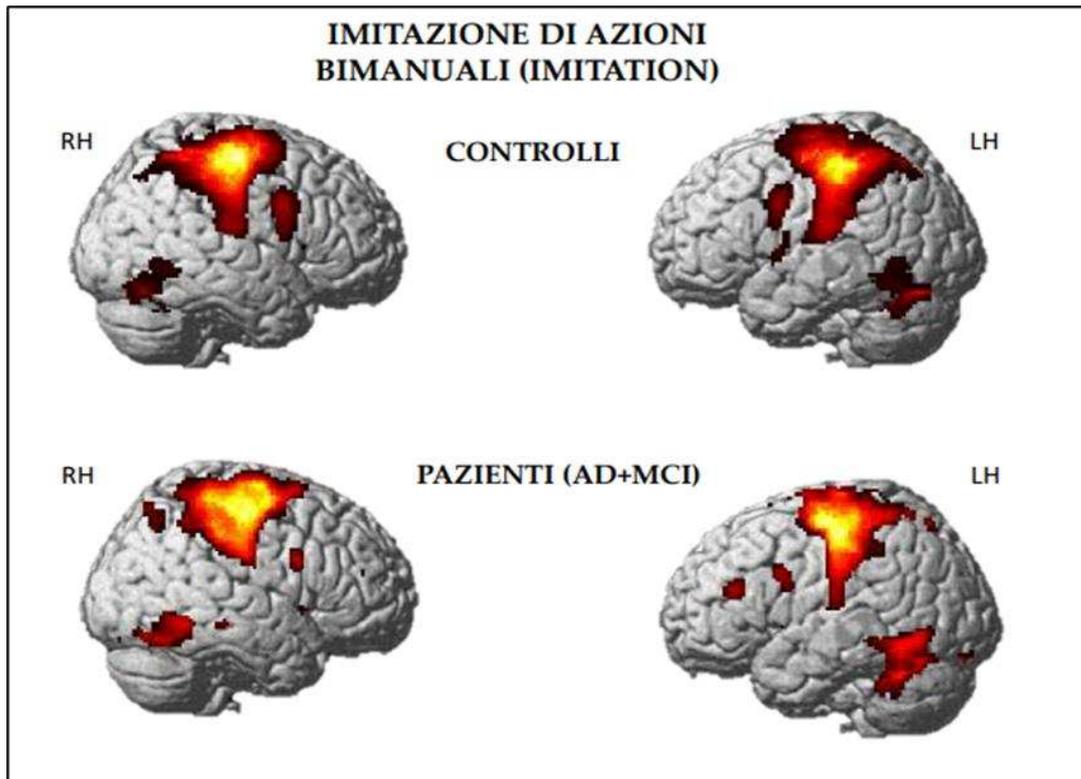


Figura 26: Attivazioni cerebrali ottenute dalla condizione *IMITATION* nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

Nel contrasto OBS FOLD vs OBS REACH nel gruppo di controllo si riscontra prevalentemente un'attivazione bilaterale del lobulo parietale inferiore e del solco intraparietale (IPS e IPL), oltre che della corteccia premotoria a destra. Nel gruppo di pazienti sembrano emergere attivazioni paragonabili a quelle dei controlli solo nell'emisfero di destra. Ciò indica che le attivazioni dell'emisfero sinistro (in particolare del parietale) dei pazienti durante OBS FOLD e OBS REACH erano in parte sovrapposte, quindi nella sottrazione vengono eliminate.

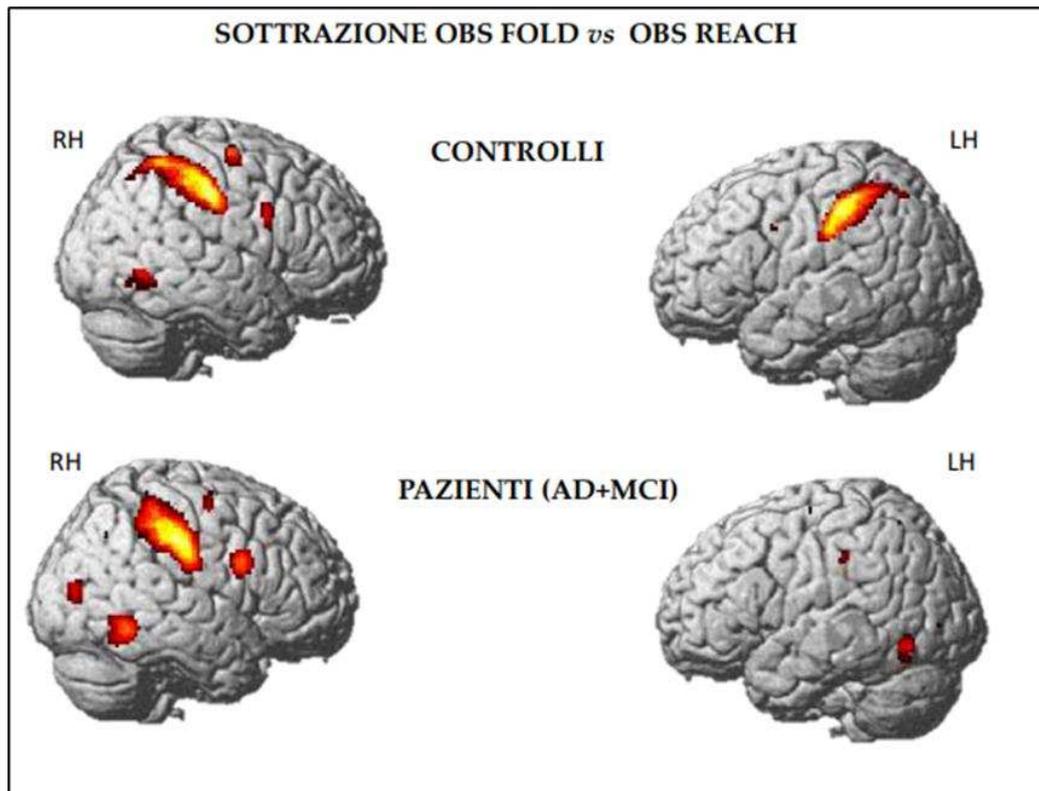


Figura 27: Attivazioni cerebrali ottenute dalla sottrazione OBS FOLD vs OBS REACH nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

Il contrasto OBS TO IMI vs OBS FOLD, determina nel gruppo di controllo l'attivazione della corteccia prefrontale, della corteccia premotoria, della somatosensoriale primaria, e della corteccia parietale inferiore nell'emisfero sinistro. Nell'emisfero destro è presente un piccolo cluster di attivazione della corteccia premotoria. Le attivazioni nel gruppo di pazienti relative allo stesso contrasto coinvolgono esclusivamente la corteccia prefrontale nell'emisfero sinistro.

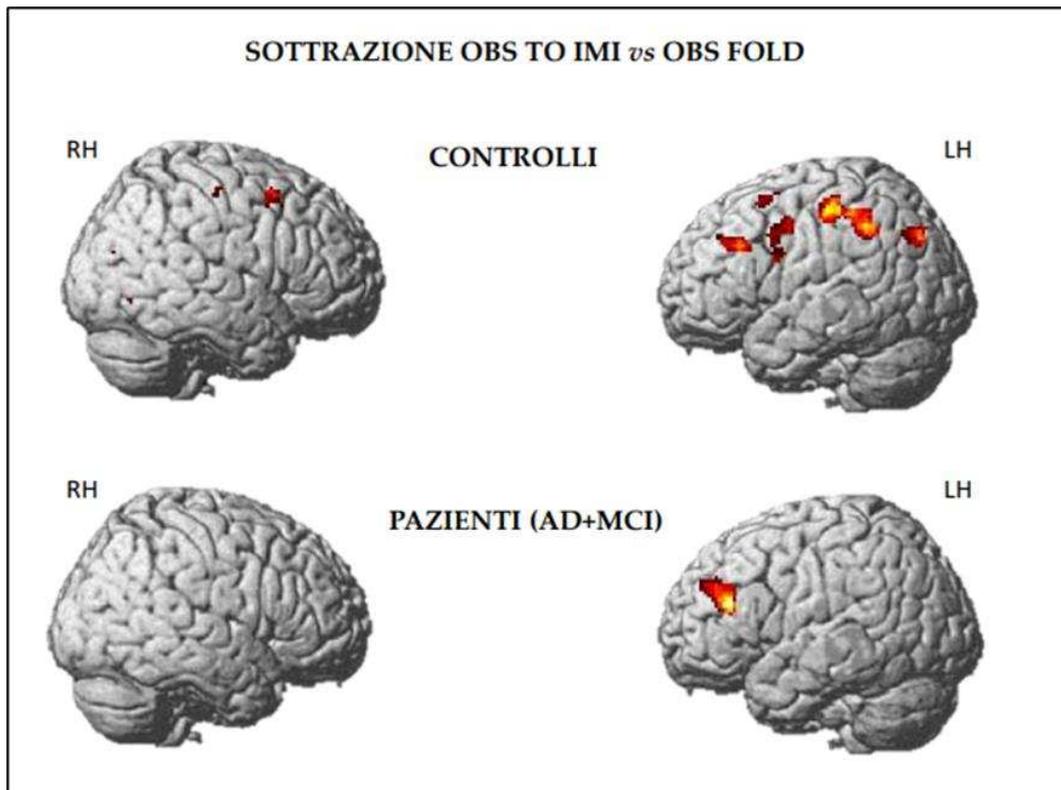


Figura 28: Attivazioni cerebrali ottenute dalla sottrazione OBS TO IMI vs OBS FOLD nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

L'analisi di congiunzione tra OBS TO IMI & IMITATION nel gruppo di controllo ha rivelato la presenza di aree condivise di attivazione che includono prevalentemente la corteccia premotoria dorsale e ventrale, e la corteccia parietale inferiore bilateralmente. Nel gruppo di pazienti le attivazioni condivise includono solo parzialmente le cortecce parietali e premotorie, anche se con cluster meno estesi rispetto ai controlli. Inoltre, nell'emisfero sinistro, anche la corteccia prefrontale evidenzia una attivazione condivisa.

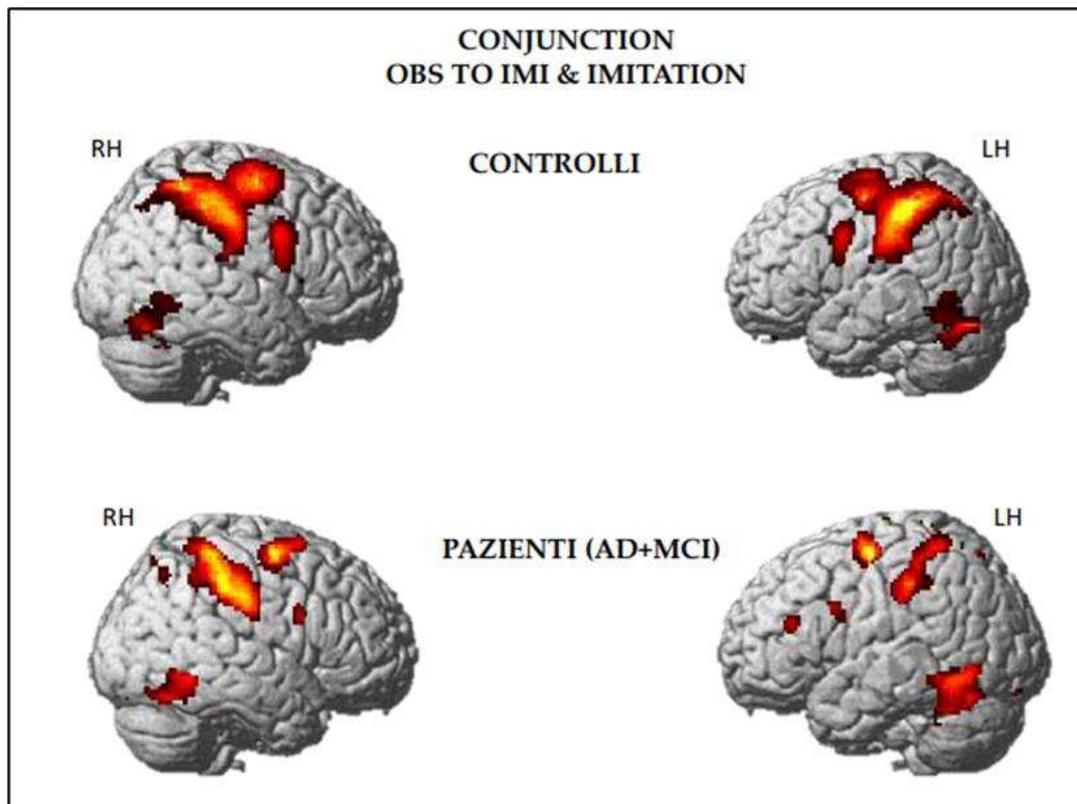


Figura 29: Attivazioni cerebrali ottenute dalla congiunzione OBS TO IMI & IMITATION nei due gruppi di controllo e pazienti. LH= emisfero sinistro; RH= emisfero destro.

4.3.3 Relazione tra attivazione funzionale e performance comportamentale

Dai risultati ottenuti dalla regressione *whole-brain* è emersa una relazione lineare tra le attivazioni fMRI ottenute dai controlli nella condizione OBS TO IMI a livello della corteccia prefrontale e i dati comportamentali relativi alla performance quantitativa degli stessi partecipanti. Quindi i soggetti che avevano una buona attivazione durante il task di osservazione per imitare, tendenzialmente mostravano anche una buona performance imitativa.

Di seguito è stata selezionata una regione di interesse (ROI), corrispondente alla DLPFC. In Fig.30 è riportata la posizione della ROI su un template MNI, messa a confronto con due parcellizzazioni anatomiche della DLPFC nell'uomo e nel primate non umano. Il

cluster attivo sulla corteccia prefrontale corrisponde al giro frontale medio, area 46 di Brodmann.

CONFRONTO DLPFC NEI PARTECIPANTI (SANI) E NELLA SCIMMIA

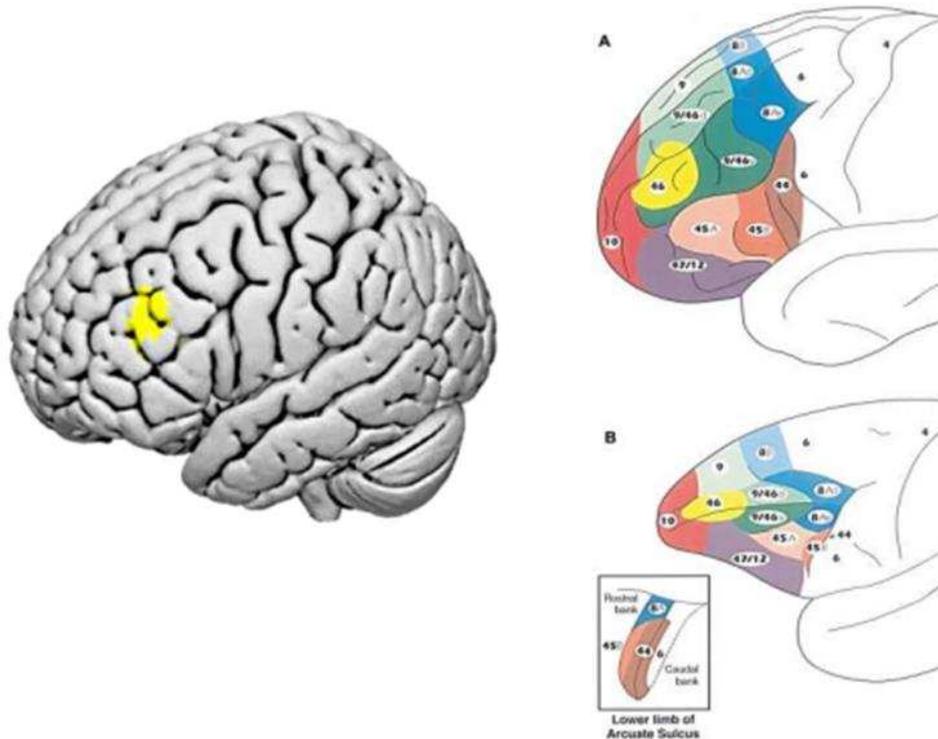


Fig 30: Confronto tra regione DLPFC ottenuta dalla regressione lineare tra attivazioni fMRI in OBS TO IMI e performance comportamentale (a sinistra) e localizzazione DLPFC nell'uomo secondo la mappa di Brodmann (A) e nella scimmia secondo la mappa di Walker (B), a destra.

Per verificare l'esistenza di una relazione simile tra attivazione BOLD e performance comportamentale nei pazienti è stata eseguita un'analisi utilizzando la stessa ROI ottenuta nello studio sui controlli. In figura 31 sono riportati i risultati ottenuti da tale regressione nel gruppo di controllo (A) e nel gruppo di pazienti (B). Da un'analisi generale in cui si è indagata l'intensità del segnale BOLD del cluster corrispondente alla DLPFC nelle diverse condizioni (OBS FOLD, OBS REACH, OBS TO IMI, IMITATION) è emerso un segnale più intenso nella condizione OBS TO IMI rispetto alle altre condizioni oggetto di analisi sia nel gruppo di controllo che nel gruppo di pazienti. Tale dato conferma i risultati fMRI ottenuti

dal contrasto precedentemente descritto (OBS TO IMI vs OBS FOLD) che ha rivelato un effetto nella DLPFC in entrambi i gruppi. Nel gruppo di controllo la correlazione tra il cambiamento del segnale BOLD e la performance quantitativa risulta significativa, anche se a soglia ($T=2.07$; $p=0.05$). Per quanto riguarda il gruppo di pazienti, lo *scatterplot* sembra mettere in luce un andamento lineare positivo, ma la bassa potenza statistica non consente ulteriori verifiche e dunque serviranno in futuro maggiori approfondimenti.

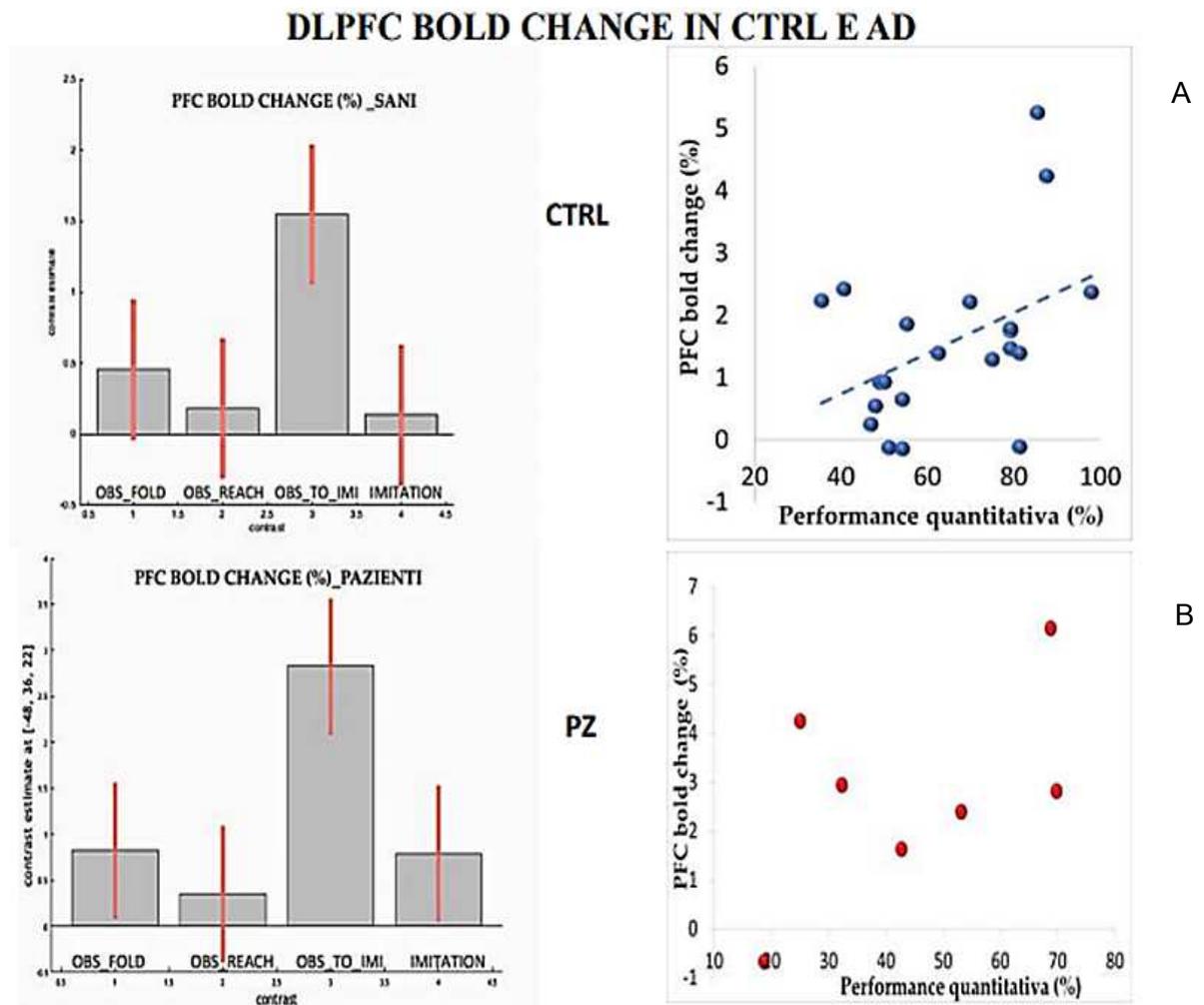


Figura 31: A sinistra, istogramma che rappresenta il segnale BOLD del cluster corrispondente alla DLPFC nelle diverse condizioni OBS FOLD, OBS REACH, OBS TO IMI e IMITATION. A destra, scatterplot che raffigura la relazione lineare tra il cambiamento del segnale BOLD nella DLPFC nel gruppo di controllo (A) e nel gruppo di pazienti (B).

DISCUSSIONE

Nel presente studio fMRI è stata indagata la capacità imitativa dei pazienti AD e i rispettivi correlati neurofisiologici. I risultati della parte comportamentale dello studio hanno dimostrato che i pazienti presentano in generale una prestazione maggiormente deficitaria rispetto al gruppo di controllo. Nello specifico, i pazienti (MCI + AD) presentano una performance imitativa quantitativa più scarsa rispetto al gruppo di controllo, dunque una minore abilità di riprodurre il *goal* della sequenza del compito. Tuttavia, essi sono in grado di imitare qualitativamente i passaggi e le pieghe svolte dal modello, dimostrando così un tentativo di riprodurre gli stessi movimenti eseguiti dall'attore. Per fare questo, però, i pazienti impiegano più tempo nell'eseguire il compito rispetto al gruppo di adulti sani. Inoltre, le difficoltà dell'esecuzione del task nello scanner di risonanza e il tempo massimo predefinito per l'esecuzione del compito (16 secondi) hanno probabilmente inciso sul numero di movimenti aggiuntivi eseguiti dal gruppo di controllo e dal gruppo di pazienti, che infatti non presentano differenze. Uno studio¹ condotto precedentemente su adulti sani e pazienti AD di pari età che ha proposto lo stesso tipo di compito (imitazione di azioni complesse bimanuali per la formazione di un origami) in un contesto ambientale neutro, dunque al di fuori dello scanner di risonanza, ha dimostrato che i pazienti tendono in media ad aggiungere più passaggi non presenti nelle sequenze di quanto non facciano i controlli (1.17 ± 0.66 nei pazienti vs 0.64 ± 0.28 nei controlli). Tale dato dimostrerebbe dunque che la difficoltà derivante dal setting di risonanza incide sul numero di aggiunte eseguite da entrambi i gruppi.

Anche se i pazienti (MCI + AD) dimostrano una prestazione comportamentale generale meno abile rispetto al gruppo di controllo, l'analisi dei risultati dei singoli pazienti, in cui sono stati distinti i pazienti MCI dai pazienti AD, ha dimostrato tendenzialmente punteggi

¹ Ciullo, G. (2021). *Imitazione di azioni complesse in pazienti con malattia di Alzheimer e sua possibile relazione con il sistema mirror: uno studio comportamentale e di fMRI* (Tesi Magistrale, Università di Parma. Dipartimento di Medicina e Chirurgia).

più scarsi nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti MCI, abbassando probabilmente i punteggi medi ottenuti nelle diverse variabili prese in analisi.

Per quanto riguarda le attivazioni fMRI, la condizione di osservazione passiva del movimento di manipolazione del foglio (OBS FOLD) nel gruppo di controllo ha determinato l'attivazione bilaterale del classico *action observation network* riscontrato in letteratura: tale dato, dunque, appare un buon confronto con studi che hanno indagato i correlati neurofisiologici durante compiti bimanuali. Nel gruppo di pazienti, anche se l'estensione dello stesso cluster risulta paragonabile, appare tuttavia una minore attivazione della corteccia premotoria ventrale e del lobulo parietale inferiore nell'emisfero sinistro. L'unico studio ad aver indagato l'osservazione passiva in adulti sani e nei pazienti AD è quello condotto da Farina e collaboratori (2017). Quest'ultimo lavoro presenta tuttavia il limite di non citare i risultati fMRI ottenuti nella condizione di osservazione passiva nel gruppo di pazienti, ma solo i risultati della *conjunction* tra pantomima e osservazione passiva. I dati ottenuti possono dunque essere considerati come risultati innovativi circa le attivazioni cerebrali dei pazienti AD in una condizione di osservazione passiva.

Per quanto riguarda la condizione di osservazione dei movimenti di raggiungimento del foglio (OBS REACH) nei controlli è interessante notare una minore attivazione del circuito parieto-premotorio rispetto alla condizione precedente (OBS FOLD), prevalentemente dovuta all'elaborazione del movimento di raggiungimento e non di manipolazione del foglio. Anche nel gruppo di pazienti sono riscontrate le stesse attivazioni occipito-temporali e parzialmente quelle parietali e premotorie, anche se meno estese. Dunque, confrontando pazienti Alzheimer e adulti sani di pari età su un compito di osservazione di movimento semplice di raggiungimento, non emergono differenze eclatanti, quantomeno in termini dei tipi di aree attivate.

Per quanto riguarda le attivazioni ottenute durante il compito di osservazione per imitare (OBS TO IMI), nel gruppo di controllo sono state riscontrate attivazioni bilaterali delle

classiche regioni *mirror*, oltre che di quelle visive, della corteccia prefrontale (PFC) e della corteccia somatosensoriale primaria. Studi su sani in compiti di imitazione avevano già mostrato un aumento dell'attivazione della corteccia prefrontale durante l'osservazione di azioni che dovevano essere successivamente riprodotte (Buccino et al., 2004). Nei pazienti emerge una forte attivazione prefrontale che non è invece presente nella condizione di osservazione passiva. Tale dato conferma dunque che le due condizioni di osservazione non sono identiche. Ad opera della corteccia prefrontale, singoli elementi motori, già presenti nel sistema dei neuroni specchio, vengono selezionati e combinati in un nuovo pattern motorio. Inoltre, le attivazioni cerebrali osservate nel compito fMRI corrispondono alle attivazioni classiche riportate negli studi fMRI di osservazione di azioni (Caspers et al., 2010; Molenberghs et al., 2012).

Nella condizione di esecuzione (IMITATION) nel gruppo di controllo appare, come atteso, un'attivazione della corteccia motoria, implicata nel movimento delle mani per eseguire il compito. Nel compito motorio è presente l'attivazione del giro frontale inferiore che non è presente nella condizione di osservazione passiva (OBS FOLD). Nel gruppo di pazienti, per quanto riguarda le aree sensorimotorie, il pattern è paragonabile al gruppo di controllo, ma in tale condizione i pazienti attivano la corteccia prefrontale che non è invece attiva nel gruppo di adulti sani, quasi come se i pazienti stessero ancora compiendo parte del processo di riorganizzazione e pianificazione della propria azione in base al modello osservato. Alternativamente, l'attivazione prefrontale presente nei pazienti potrebbe essere dovuta all'intervento di processi attenzionali endogeni o a tentativi di richiamo dalla memoria.

Per quel che concerne il contrasto tra le due condizioni di osservazione passiva (OBS REACH vs OBS FOLD) nel gruppo di controllo è stata riscontrata un'attivazione bilaterale del lobulo parietale inferiore e del solco intraparietale, mentre nei pazienti le stesse attivazioni sono state rilevate solo nell'emisfero di destra. Dunque, le condizioni OBS

REACH e OBS FOLD erano in parte sovrapposte nell'emisfero sinistro. È possibile che nel gruppo di pazienti la condizione OBS REACH determinasse un'attivazione sottosoglia della corteccia parietale, sparendo così nel contrasto. Alternativamente, è probabile che quest'ultimo risulti molto forte statisticamente e dunque non faccia emergere l'attivazione parietale nell'emisfero sinistro. Si noti che nel gruppo di controllo la corteccia parietale inferiore era attiva nella condizione OBS FOLD, ma non era attiva nella condizione OBS REACH. Nei pazienti, invece, l'attivazione della corteccia parietale era poco attiva anche nella condizione OBS REACH, e dunque nel contrasto verrebbe eliminata.

Il contrasto OBS TO IMI vs OBS FOLD nel gruppo di controllo rivela un'attivazione del classico pattern parieto-premotorio bilateralmente, incluse anche la corteccia prefrontale e somatosensoriale, mentre le attivazioni del gruppo di pazienti relative allo stesso contrasto coinvolgono esclusivamente la corteccia prefrontale nell'emisfero sinistro. Questi risultati confermano il fatto che l'osservazione dell'azione attiva il sistema mirror fronto-parietale e che, verosimilmente, il coinvolgimento della corteccia prefrontale sia presente principalmente in relazione alla prevista futura imitazione. L'attivazione prefrontale nell'emisfero sinistro riscontrata nel gruppo di pazienti potrebbe essere interpretata come un tentativo da parte del paziente di elaborare le informazioni utili alla successiva imitazione, senza essere tuttavia supportata dall'attivazione delle aree facenti parte del Sistema Specchio. Un altro dato interessante riguarda la superiorità dell'emisfero sinistro riscontrata sia nel gruppo di pazienti che nel gruppo di adulti sani. Quest'ultima potrebbe dipendere dalla preferenza manuale dei partecipanti, in quanto destrimani, unita alla ben nota specializzazione pragmatica dell'emisfero sinistro.

Anche l'analisi di congiunzione tra la condizione di esecuzione (IMITATION) e la condizione di osservazione passiva rivela, come atteso, l'attivazione del classico circuito *mirror* nel gruppo di controllo, coinvolgendo la corteccia premotoria ventrale e dorsale e la corteccia parietale inferiore bilateralmente. Tuttavia, nel gruppo di pazienti lo stesso pattern

è paragonabile ai controlli solo a destra, mentre nell'emisfero sinistro tali attivazioni risultano meno estese. Dunque, le aree *mirror* sinistra sono molto più ristrette e non risulta una vera e propria sovrapposizione tra imitazione e osservazione nel gruppo di pazienti. D'altro canto, nel gruppo di pazienti appare l'attivazione della corteccia prefrontale nell'emisfero sinistro che è invece assente nel gruppo di controllo. La mancanza dell'attivazione comune della corteccia prefrontale nel gruppo di controllo era attesa in quanto questa regione cerebrale non si attiva durante l'esecuzione. Tuttavia, nei pazienti emerge, durante l'imitazione vera e propria, un pattern prefrontale in parte inatteso che può far riferimento a vari fattori di difficoltà, attenzionali e mnemonici, che i pazienti potrebbero affrontare nel tentativo di eseguire correttamente il compito.

Considerando le attivazioni determinate dalla condizione OBS TO IMI nei singoli pazienti (MCI 3 e AD 4), nel paziente MCI è risultata una iperattivazione generalizzata che coinvolge le cortecce prefrontale, premotoria, parietale, occipitale, temporale e del cervelletto, mentre nel paziente AD 4 emerge, al contrario, una ipoattivazione che include solo piccoli cluster bilaterali della corteccia parietale superiore, della corteccia premotoria, e della corteccia temporale posteriore. Un dato interessante riguarda dunque la preservata attivazione, e dunque l'integro funzionamento delle aree facenti parte del Sistema Specchio nei pazienti MCI a discapito dei pazienti AD in cui incomincia ad essere evidente un ipofunzionamento dello stesso meccanismo. L'iperattivazione riscontrata nei pazienti MCI potrebbe dipendere da uno sforzo da parte del cervello per l'esecuzione del compito e per sopperire alla ridotta attivazione delle regioni parietali intaccate dalla patologia. Inoltre, tali risultati sono coerenti con il quadro neuropsicologico e con i dati comportamentali ottenuti dai pazienti stessi. Nello specifico, mentre il paziente MCI 3 presenta una performance quantitativa pari a circa il 70%, il paziente AD 4 mostra una performance inferiore al 20%. Inoltre, se si considerano i punteggi ottenuti al test dell'Orologio (v. par 4.1), il paziente MCI 3 ha riportato un PE=4 e l'orologio disegnato risulta nella norma. D'altro canto, il paziente AD 4 ha ottenuto al Test dell'Orologio un PE=0, in quanto il disegno presenta diversi

elementi interferenti (si noti il 4 e mezzo presente a destra), oltre che diverse cancellature e imprecisioni. Il quadro neuropsicologico dei pazienti sembra dunque essere riflesso nelle attivazioni fMRI ottenute. Tali risultati confermerebbero le ipotesi di alcuni studi (Farina et al., 2017) secondo le quali il training AOT vada proposto in una fase prodromica della malattia, quando le attivazioni parieto-premotorie sono ancora parzialmente presenti.

L'AOT è una strategia neuroriabilitativa di apprendimento motorio caratterizzata dall'osservazione-imitazione delle azioni in quanto ai soggetti viene chiesto prima di osservare una determinata azione e successivamente di eseguirla. Questa terapia mira a migliorare la plasticità cerebrale, reclutando e stimolando lo stesso circuito mirror e favorendo in questo modo la facilitazione della risposta motoria (Sgandurra et al., 2013; Buccino et al., 2012; Franceschini et al. 2012).

Dai risultati ottenuti dalla regressione *whole-brain* è emersa una relazione lineare tra le attivazioni fMRI ottenute dai controlli nella condizione OBS TO IMI a livello della corteccia prefrontale e i dati comportamentali relativi alla performance quantitativa degli stessi partecipanti, come già suggerito dall'analisi delle attivazioni ottenute dal contrasto OBS TO IMI *vs* OBS FOLD. I risultati ottenuti sono coerenti con i risultati di diversi studi che hanno indagato i correlati neurofisiologici durante una condizione di osservazione per imitare (Buccino et al., 2004; Vogt et al., 2007). Nello specifico, Buccino e colleghi (Buccino et al., 2004) hanno realizzato uno studio fMRI in cui sono stati reclutati soggetti sani che non avevano mai suonato una chitarra. Essi erano invitati ad osservare un video in cui si vedeva la mano di un chitarrista professionista mentre eseguiva alcuni accordi, e ad imitare, dopo un breve pausa, gli accordi visti. I risultati hanno dimostrato che l'osservazione degli accordi a scopo imitativo determinava l'attivazione del circuito dei neuroni specchio, confermando un suo ruolo nell'apprendimento per imitazione, mentre durante la pausa prima dell'esecuzione imitativa compariva anche un'intensa ed estesa attivazione di una regione della corteccia frontale corrispondente all'area 46 di Brodmann e di aree della corteccia

mesiale anteriore. Appare evidente come la trasformazione dell'informazione visiva in un'opportuna risposta motoria avvenga nel sistema dei neuroni specchio (Rizzolatti & Sinigaglia, 2006). Tuttavia, le risposte rilevate durante le pause prima dell'imitazione sembrano indicare che l'attivazione del Sistema Specchio avvenga sotto il controllo di alcune aree della corteccia frontale, in particolare dell'area 46 di Brodmann, e della corteccia mesiale anteriore.

Diversi autori (Fuster & Alexander, 1971; Funahashi et al., 1990) in passato hanno attribuito all'area 46 funzioni prevalentemente legate alla *working memory*, ossia alla capacità di elaborare e mantenere nel breve termine informazioni e sequenze motorie. I dati del presente esperimento, tuttavia, suggeriscono che l'area 46 sia anche responsabile della ricombinazione dei singoli atti motori e della definizione di un nuovo pattern d'azione il più possibile corrispondente a quello esemplificato dal modello.

È stato dimostrato, inoltre, che la DLPFC è attiva non solo durante l'osservazione delle azioni, ma anche durante la preparazione motoria (Vogt et al., 2007). Nello specifico, l'area 46 risulta maggiormente attiva durante l'osservazione delle azioni e della preparazione motoria degli accordi sconosciuti, mentre durante l'esecuzione di quelli conosciuti l'attivazione di tale area risulta notevolmente diminuita o assente.

La funzione della DLPFC si può interpretare in termini di integrazione delle informazioni sensoriali e motorie e di selezione del comportamento appropriato, oltre a dimostrare un ruolo nelle operazioni non di routine. La sua attivazione sembra invece diminuire con l'apprendimento e il consolidamento dell'azione. Dunque, quando è richiesto un comportamento imitativo, le azioni nuove da osservare vengono scomposte in micro-sequenze familiari attraverso la risonanza motoria del sistema dei neuroni specchio (Buccino et al., 2004). Le combinazioni di tali micro-sequenze in nuove azioni configurate procedono sotto il controllo supervisore della corteccia prefrontale dorsolaterale sinistra.

Riassumendo, dai risultati del presente studio pilota è emerso che i pazienti MCI e AD possono in parte imitare azioni complesse. Sia in termini di performance quantitativa che di performance qualitativa, i pazienti MCI presentano descrittivamente dei punteggi più alti rispetto ai pazienti Alzheimer. Per quanto riguarda i pazienti MCI, tale capacità preservata dipende da meccanismi di risonanza motoria, promossi dal Sistema Specchio, anch'essi parzialmente funzionanti. In fasi più avanzate della malattia, invece, il Sistema Specchio sembra andare in contro ad un ipofunzionamento, probabilmente provocato da una degenerazione del lobo parietale che non consentirebbe la giusta integrazione del circuito. I pazienti Alzheimer dunque, più che una preservata capacità imitativa, dimostrano dei *tentativi* di eseguire da soli il compito, come confermato anche dalla forte attivazione prefrontale presente nelle condizioni OBS TO IMI vs REST e nel contrasto OBS TO IMI vs OBS FOLD.

CONCLUSIONI

Il presente studio fMRI ha provato a rispondere a diverse ipotesi sperimentali descritte nella sezione OBIETTIVI DELLO STUDIO E IPOTESI (pagina 44).

In primo luogo, i risultati fMRI hanno confermato una maggiore attivazione del Sistema Specchio nei pazienti MCI rispetto ai pazienti AD. Quindi, le possibili proposte riabilitative sono soprattutto rivolte a questi ultimi, coerentemente con quanto emerso da alcuni studi in letteratura (Farina et al., 2017; Farina et al., 2020). L'ipotesi è quella di proporre l'AOT come strategia riabilitativa intenta ad intervenire sul comportamento imitativo/motorio dei pazienti AD, rallentando il progressivo decorso della malattia stimolando gli aspetti motori, con una conseguente ricaduta anche su quelli cognitivi. Tuttavia, non molti studi hanno indagato l'efficacia della terapia AOT in pazienti appartenenti al continuum della malattia di Alzheimer e i pochi dati a disposizione risultano negativi (Caffarra et al., 2006). Inoltre, non esistono numerosi dati in merito alla capacità imitativa dei pazienti AD. L'unico studio comportamentale presente, e volto ad indagare le capacità imitative dei pazienti Alzheimer,

è quello condotto da Bisio e collaboratori (2016). In questo studio i ricercatori hanno dimostrato che i pazienti AD presentano una buona e inalterata capacità di riprodurre la cinematica di movimenti semplici osservati, soprattutto quando lo stimolo è rappresentato dal movimento di una persona reale. In accordo con lo studio di Bisio e collaboratori, i risultati del presente lavoro hanno dimostrato che i pazienti MCI, più degli AD, non solo sono in grado di imitare semplici movimenti, ma riescono ad imitare, sebbene peggio dei controlli, anche sequenze motorie complesse bimanuali (origami). L'efficacia del trattamento AOT è stata dimostrata soprattutto nel recupero delle autonomie, che hanno riscosso particolare successo soprattutto in pazienti parkinsoniani (Pelosin et al., 2013), bambini con paralisi cerebrale infantile (Errante et al., 2019) ed anche in pazienti colpiti da ictus (Franceschini et al., 2010). I risultati dimostrano l'esistenza di un effettivo miglioramento delle attività funzionali nei pazienti che hanno eseguito il training. Affinché l'AOT possa potenziare gli aspetti motori e cognitivi nei pazienti AD, essa dovrebbe essere tuttavia proposta in una fase prodromica della malattia, dunque in una fase in cui il sistema dei neuroni specchio è ancora parzialmente preservato nelle aree frontali, a discapito di quelle parietali, che sono maggiormente intaccate dalla patologia.

Per verificare, invece, se l'attivazione del Sistema Specchio dipende dal gradiente cerebrale di coinvolgimento caudo-rostrale è necessario un campione più allargato di pazienti che manifestano diversi gradienti di degenerazione. In futuro serviranno dunque maggiori approfondimenti.

Infine, come effetto di una possibile compensazione, nei pazienti AD vi è il reclutamento della corteccia prefrontale dorsolaterale (area 46 di Brodmann). È stato dimostrato che più è attiva questa regione prefrontale, migliore risulta la performance imitativa nei partecipanti. I pazienti impiegano un maggiore sforzo nell'imitazione e anche la forte attivazione della corteccia prefrontale riscontrata in alcuni pazienti offre spunti interessanti in merito alla presentazione di training riabilitativi.

L'obiettivo principale è quindi quello di elaborare delle strategie utili, che possano ritardare il declino funzionale e migliorare pertanto la qualità di vita dei pazienti stessi e di coloro che li assistono.

Come per le altre strategie riabilitative, anche nel caso della riabilitazione per i pazienti MCI e AD è bene considerare le differenze che intercorrono tra i diversi pazienti. Il training riabilitativo dovrebbe essere "ritagliato" sulle caratteristiche del singolo paziente a seguito di un'importante analisi del suo quadro clinico generale e di un'attenta valutazione del tipo di movimenti che è in grado di imitare (semplici o complessi).

La bassa numerosità campionaria è da considerarsi un limite di questo studio, così come la difficoltà del setting in cui i partecipanti hanno dovuto svolgere il compito fMRI.

Con questi, e con altri risultati futuri più approfonditi, sarà possibile valutare se la stimolazione del Sistema Specchio mediante l'AOT possa rappresentare un'efficace soluzione terapeutica per i pazienti appartenenti al continuum della Malattia di Alzheimer, con l'ambizione di offrire un aiuto concreto a questi pazienti, di migliorare la loro qualità di vita e di regalare loro nuove opportunità affinché non vivano in un "eterno presente".

"La memoria è la somma di tutto ciò che ricordiamo e dimentichiamo, ed esistono un'arte e una scienza per entrambe le cose".

(Genova, 2021)

BIBLIOGRAFIA

- Accorrà, D., Mazzarini, I., Girardi, P., Ruberto, A., Kotzalidis, G. D., & Tatarelli, R. (2004). Valutazione neuropsicologica e comportamentale nel morbo di Alzheimer. *Ann Ist Super Sanità*, 40(4), 485-493.
- Agosta, F., Rocca, M. A., Pagani, E., Absinta, M., Magnani, G., Marcone, A., ... & Filippi, M. (2010). Sensorimotor network rewiring in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Human brain mapping*, 31(4), 515-525. DOI: <https://doi.org/10.1002/hbm.20883>.
- Ahmed, S., Haigh, A. M. F., de Jager, C. A., & Garrard, P. (2013). Connected speech as a marker of disease progression in autopsy-proven Alzheimer's disease. *Brain*, 136(12), 3727-3737. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awt269>.
- Alzheimer's association, Che cos'è la demenza? In «alz.org italia». <https://www.alz.org/it/demenza-alzheimer-italia.asp>.
- Anthony, J. C., LeResche, L., Niaz, U., Von Korff, M. R., & Folstein, M. F. (1982). Limits of the 'Mini-Mental State' as a screening test for dementia and delirium among hospital patients. *Psychological medicine*, 12(2), 397-408. DOI: 10.1017/S0033291700046730.
- Arevalo-Rodriguez, I., Smailagic, N., Roqué-Figuls, M., Ciapponi, A., Sanchez-Perez, E., Giannakou, A., Pedraza, OL., Bonfill Cosp, X., Cullum, S. (2021). Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*. DOI: 10.1002/14651858.CD010783.

- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am*, 103(2):263-293. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.10.009.

- Bak, T. H. (2013). The neuroscience of action semantics in neurodegenerative brain diseases. *Current opinion in neurology*, 26(6), 671-677.

- Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. DOI: 10.1016/j.npep.2015.06.008.

- Barkhof, F., Fox, N.C., Bastos-Leite, A.J., Scheltens, P. (2011). Neuroimaging in Dementia. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. DOI: 10.1007/978-3-642-00818-4_4.

- Bartels, C., Wagner, M., Wolfsgruber, S., Ehrenreich, H., Schneider, A. (2018). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Impact of SSRI therapy on risk of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's dementia in individuals with previous depression. *American Journal of Psychiatry*, 175(3), 232-241.
DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17040404>.

- Beckmann, CF., Smith, SM (2004). Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging*, 23(2):137-52. DOI: 10.1109/TMI.2003.822821.

- Berardelli A., Cruccu G., (2019). *La neurologia della Sapienza*. Società Editrice Esculapio.

- Bergeron, D., Flynn, K., Verret, L., Poulin, S., Bouchard, R. W., Bocti, C., ... & Laforce, R. J. (2017). Multicenter Validation of an MMSE-Mo CA Conversion Table. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(5), 1067-1072. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgs.14779>.

- Bisio, A., Casteran, M., Ballay, Y., Manckoundia, P., Mourey, F., & Pozzo, T. (2012). Motor resonance mechanisms are preserved in Alzheimer's disease patients. *Neuroscience*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.017>.
- Bisio, A., Casteran, M., Ballay, Y., Manckoundia, P., Mourey, F., & Pozzo, T. (2016). Voluntary imitation in Alzheimer's disease patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00048>.
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's disease: past, present, and future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9- 10), 818. DOI:10.1017/S1355617771700100X.
- Bonini, L., Rozzi, S., Serventi, F. U., Simone, L., Ferrari, P. F., & Fogassi, L. (2010). Ventral premotor and inferior parietal cortices make distinct contribution to action organization and intention understanding. *Cerebral Cortex*, 20(6), 1372-1385.
- Boss, MA. (2000). Diagnostic approaches to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1502(1):188-200. DOI: 10.1016/s0925-4439(00)00044-2.
- Brass, M., Schmitt, R. M., Spengler, S., & Gergely, G. (2007). Investigating action understanding: inferential processes versus action simulation. *Current biology*, 17(24), 2117-2121.
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Barth.

- Buccino, G., Vogt, S., Ritzl, A., Fink, G. R., Zilles, K., Freund, H. J., & Rizzolatti, G. (2004). Neural circuits underlying imitation learning of hand actions: an event-related fMRI study. *Neuron*, 42(2), 323-334. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00181-3).

- Byrne, R. W., & Russon, A. E. (1998). Learning by imitation: A hierarchical approach. *Behavioral and brain sciences*, 21(5), 667-684. DOI: 10.1017/S0140525X98001745.

- Caffarra, P., Vezzadini, G., Dieci, F., Zonato, F., & Venneri, A. (2002). Una versione abbreviata del test di Stroop: dati normativi nella popolazione italiana. *Nuova Rivista di Neurologia*, 12(4), 111-11.

- Caffarra, P., Vezzadini, G., Dieci, F., Zonato, F., & Venneri, A. (2002). Una versione abbreviata del test di Stroop: dati normativi nella popolazione italiana. *Nuova Rivista di Neurologia*, 12(4), 111-11.

- Caffarra, P., Gardini, S., Zonato, F., Concari, L., Dieci, F., Copelli, S., ... & Venneri, A. (2011). Italian norms for the Freedman version of the Clock Drawing Test. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 33(9), 982-988.
DOI: <https://doi.org/10.1080/13803395.2011.589373>.

- Caffarra, P., Perini, M., Reda, V., Barocco, F., Michelini, G., Spallazzi, M., ... & Gardini, S. (2016). P2-017: The Effectiveness of Action Observation Treatment (AOT) in Alzheimer's Disease: Benefit on Temporal Orientation and Visuo-Prassic Abilities. *Alzheimer's & Dementia*, 12, P615-P615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.1221>.

- Calvo-Merino, B., Glaser, D. E., Grèzes, J., Passingham, R. E., & Haggard, P. (2005). Action observation and acquired motor skills: an fMRI study with expert dancers. *Cerebral cortex*, 15(8), 1243-1249. DOI: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi007>.
- Calvo-Merino, B., Grèzes, J., Glaser, D. E., Passingham, R. E., & Haggard, P. (2006). Seeing or doing? Influence of visual and motor familiarity in action observation. *Current biology*, 16(19), 1905-1910. DOI: 10.1016/j.cub.2006.07.065.
- Cambier J., Masson M., Dehen H., (2005) *Neurologia*. Elsevier Editore.
- Cambier J., Masson M., Dehen H., (2009) *Neurologia*. Edra Masson Editore.
- Candela, F., Zucchetti, G., Magistro, D., & Rabaglietti, E. (2015). The effects of a physical activity program and a cognitive training program on the long-term memory and selective attention of older adults: a comparative study. *Activities, Adaptation & Aging*, 39(1), 77-91.
- Capasso, R., & Miceli, G. (2001). *Esame Neuropsicologico per l'Afasia: ENPA* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Caspers, S., Zilles, K., Laird, A. R., & Eickhoff, S. B. (2010). ALE meta-analysis of action observation and imitation in the human brain. *Neuroimage*, 50(3), 1148-1167.
- Catricalà, E., Gobbi, E., Battista, P., Miozzo, A., Polito, C., Boschi, V., ... & Garrard, P. (2017). SAND: a Screening for Aphasia in NeuroDegeneration. Development and normative data. *Neurological Sciences*, 38(8), 1469-1483. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3001-y>.

- Celone, K. A., Calhoun, V. D., Dickerson, B. C., Atri, A., Chua, E. F., Miller, S. L., ... & Sperling, R. A. (2006). Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10222-10231. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2250-06.2006>.
- Chartrand, T. L., & Bargh, J. A. (1999). The chameleon effect: the perception-behavior link and social interaction. *Journal of personality and social psychology*, *76*(6), 893. DOI: <https://doi.org/10.1037/0022-3514.76.6.893>.
- Chen, H., Liu, S., Ji, L., Wu, T., Ji, Y., Zhou, Y., Zheng, M., Zhang, M., Xu, W., Huang, G. (2016). Folic Acid Supplementation Mitigates Alzheimer's Disease by Reducing Inflammation: A Randomized Controlled Trial. *Mediators Inflamm*. DOI: 10.1155/2016/5912146.
- Ciullo, G. (2021). *Imitazione di azioni complesse in pazienti con malattia di Alzheimer e sua possibile relazione con il sistema mirror: uno studio comportamentale e di fMRI* (Tesi Magistrale, Università di Parma. Dipartimento di Medicina e Chirurgia).
- Cronin-Golomb, A., Sugiura, R., Corkin, S., & Growdon, J. H. (1993). Incomplete achromatopsia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *14*(5), 471-477. DOI: [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90105-K](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90105-K).
- Cronk, B. B., Johnson, D. K., Burns, J. M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2010). Body mass index and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Alzheimer disease and associated disorders*, *24*(2), 126. DOI: 10.1097/WAD.0b013e3181a6bf3f.
- De Renzi, E., Motti, F., & Nichelli, P. (1980). Imitating gestures: a quantitative approach to ideomotor apraxia. *Archives of neurology*, *37*(1), 6-10.
DOI: 10.1001/archneur.1980.00500500036003.

- Di Pellegrino, G., Fadiga, L., Fogassi, L., Gallese, V., & Rizzolatti, G. (1992). Understanding motor events: a neurophysiological study. *Experimental brain research*, 91(1), 176-180. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00230027>.
- Edwards, D. F., Deuel, R. K., Baum, C. M., & Morris, J. C. (1991). A quantitative analysis of apraxia in senile dementia of the Alzheimer type: stage-related differences in prevalence and type. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2(3), 142-149. DOI: <https://doi.org/10.1159/000107189>.
- Eggermont, L. H., Swaab, D. F., Hol, E. M., & Scherder, E. J. (2009). Observation of hand movements by older persons with dementia: effects on cognition. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 27(4), 366-374. DOI: <https://doi.org/10.1159/000209311>.
- Errante, A., Di Cesare, G., Pinardi, C., Fasano, F., Sghedoni, S., Costi, S., ... & Fogassi, L. (2019). Mirror neuron system activation in children with unilateral cerebral palsy during observation of actions performed by a pathological model. *Neurorehabilitation and neural repair*, 33(6), 419-431. DOI: <https://doi.org/10.1177/154596831984796>.
- Fabbri-Destro, M. & Rizzolatti, G. (2008). Mirror neurons and mirror systems in monkeys and humans. *Physiology*, 23(3), 171-179. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00004.2008>.
- Fadiga, L., Fogassi, L., Pavesi, G., & Rizzolatti, G. (1995). Motor facilitation during action observation: a magnetic stimulation study. *Journal of neurophysiology*, 73(6), 2608-2611. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.6.2608>.

- Farina, E., Baglio, F., Pomati, S., d'Amico, A., Campini, I. C., Di Tella, S., ... & Pozzo, T. (2017). The mirror neurons network in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease: a functional MRI study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 371. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00371>.
- Farina, E., Borgnis, F., & Pozzo, T. (2020). Mirror neurons and their relationship with neurodegenerative disorders. *Journal of neuroscience research*, 98(6), 1070-1094. DOI: 10.1002/jnr.24579.
- Ferrarese C., (2011) *Core curriculum, Malattie del sistema nervoso*. McGraw-Hill Italia.
- Ferrari, P. F., & Rizzolatti, G. (2014). Mirror neuron research: the past and the future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1644), 20130169. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0169>.
- Ferreira, D., Verhagen, C., Hernández-Cabrera, J. A., Cavallin, L., Guo, C. J., Ekman, U., ... & Westman, E. (2017). Distinct subtypes of Alzheimer's disease based on patterns of brain atrophy: longitudinal trajectories and clinical applications. *Scientific reports*, 7(1), 1- 13. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep46263>.
- Fogassi L., Fadiga. L, Gallese V., *Neuroni specchio*.
- Fogassi, L., Ferrari, P. F., Gesierich, B., Rozzi, S., Chersi, F., & Rizzolatti, G. (2005). Parietal lobe: from action organization to intention understanding. *Science*, 308(5722), 662-667. DOI: 10.1126/science.1106138.

- Fortea, J., Vilaplana, E., Carmona-Iragui, M., Benezam, B., Videla, L., Barroeta, I., ... & Lleó, A. (2020). Clinical and biomarker changes of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: a cross-sectional study. *The Lancet*, 395(10242), 1988-1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30689-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30689-9).
- Frigaszy, D., & Visalberghi, E. (2004). Socially biased learning in monkeys. *Animal Learning & Behavior*, 32(1), 24-35. DOI: <https://doi.org/10.3758/BF03196004>.
- Franceschini, M., Agosti, M., Cantagallo, A., Sale, P., Mancuso, M., & Buccino, G. (2010). Mirror neurons: action observation treatment as a tool in stroke rehabilitation. *Eur J Phys Rehabil Med*, 46(4), 517-523.
- Frasson, P., Ghiretti, R., Catricalà, E., Pomati, S., Marcone, A., Parisi, L., ... & Clerici, F. (2011). Free and cued selective reminding test: an Italian normative study. *Neurological sciences*, 32(6), 1057-1062. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-012-0973-5>.
- Friston, K. J., Holmes, A. P., Poline, J. B., Grasby, P. J., Williams, S. C. R., Frackowiak, R. S., & Turner, R. (1995). Analysis of fMRI time-series revisited. *Neuroimage*, 2(1), 45- 53. DOI: <https://doi.org/10.1006/nimg.1995.1007>.
- Funahashi, S. (2001). Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. *Neuroscience research*, 39(2), 147-165. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00224-8](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00224-8).
- Fuster, J. M., & Alexander, G. E. (1971). Neuron activity related to short-term memory. *Science*, 173(3997), 652-654. DOI: [10.1126/science.173.3997.652](https://doi.org/10.1126/science.173.3997.652).

- Gainotti, G., Quaranta, D., Vita, M. G., & Marra, C. (2014). Neuropsychological predictors of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 38(3), 481-495. DOI: 10.3233/JAD-130881.
- Gallese, V., Fadiga, L., Fogassi, L. & Rizzolatti, G. (1996). Action recognition in the premotor cortex. *Brain*, 119(2), 593-609. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/119.2.593>.
- Gallese, V. (2007). Dai neuroni specchio alla consonanza intenzionale: meccanismi neurofisiologici dell'intersoggettività. *Rivista di psicoanalisi*, 53(1), 197-208.
- Gallese, V. (2007). Prima e al di sotto della teoria della mente: la simulazione incarnata ed i correlati neurali dell'intelligenza sociale. *Prima e al di sotto della teoria della mente*, 1000-1029.
- Garre-Olmo, J. (2018). Epidemiologia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. *Rev Neurol*, 66(11):377-386. DOI: <https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>.
- Garrison, K. A., Aziz-Zadeh, L., Wong, S. W., Liew, S. L., & Winstein, C. J. (2013). Modulating the motor system by action observation after stroke. *Stroke*, 44(8), 2247- 2253. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001105>.
- Gazzola, V., & Keysers, C. (2009). The observation and execution of actions share motor and somatosensory voxels in all tested subjects: single-subject analyses of unsmoothed fMRI data. *Cerebral cortex*, 19(6), 1239-1255. DOI: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn181>.
- Genova, L. (2021). *Di cosa sono fatti i ricordi*. Edizioni Piemme.

- Goldenberg, G. (1999). Matching and imitation of hand and finger postures in patients with damage in the left or right hemispheres. *Neuropsychologia*, 37(5), 559-566. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(98\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(98)00111-0).
- Groot, C., Hooghiemstra, A. M., Raijmakers, P. G., van Berckel, B. N., Scheltens, P., Scherder, E. J., ... & Ossenkuppele, R. (2016). The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: a meta-analysis of randomized control trials. *Ageing research reviews*, 25, 13-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.11.005>.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. DOI: [10.1126/science.1072994](https://doi.org/10.1126/science.1072994).
- Head, D., Buckner, R. L., Shimony, J. S., Williams, L. E., Akbudak, E., Conturo, T. E., ... & Snyder, A. Z. (2004). Differential vulnerability of anterior white matter in nondemented aging with minimal acceleration in dementia of the Alzheimer type: evidence from diffusion tensor imaging. *Cerebral cortex*, 14(4), 410-423. DOI: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh003>.
- Heiser, M., Iacoboni, M., Maeda, F., Marcus, J., & Mazziotta, J. C. (2003). The essential role of Broca's area in imitation. *European Journal of Neuroscience*, 17(5), 1123-1128. DOI: [10.1046/j.1460-9568.2003.02530](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02530).
- Horie, K., Barthélemy, N.R., Sato, C., Bateman, R.J. (2021). CSF tau microtubule binding region identifies tau tangle and clinical stages of Alzheimer's disease. *Brain*, 144(2):515-527. DOI: [10.1093/brain/awaa373](https://doi.org/10.1093/brain/awaa373).

- Iacoboni, M., Woods, R. P., Brass, M., Bekkering, H., Mazziotta, J. C., & Rizzolatti, G. (1999). Cortical mechanisms of human imitation. *Science*, 286(5449), 2526-2528.
DOI: 10.1126/scienza.286.5449.2526.
- Iacoboni, M., Koski, L. M., Brass, M., Bekkering, H., Woods, R. P., Dubeau, M. C., ... & Rizzolatti, G. (2001). Reafferent copies of imitated actions in the right superior temporal cortex. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(24), 13995-13999.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.241474598>.
- Iacoboni, M. (2005). Neural mechanisms of imitation. *Current opinion in neurobiology*, 15(6), 632-637. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.010>.
- Iacoboni, M., Molnar-Szakacs, I., Gallese, V., Buccino, G., Mazziotta, J. C., & Rizzolatti, G. (2005). Grasping the intentions of others with one's own mirror neuron system. *PLoS biology*, 3(3), e79. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030079>.
- Jack Jr, C. R., Albert, M., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carillo, M., ... & Phelps, C. H. (2011). Introduction to revised criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on Aging and the Alzheimer Association Workgroups. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 257.
DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.004.
- Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeblerlein, S. B., ... & Silverberg, N. (2018). NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.

- Kirova, AM., Bays, RB., Lagalwar, S. (2015). Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Biomed Res*. DOI: 10.1155/2015/748212.
- L. Hauser, S., (2007) *Neurologia Clinica*. McGraw-Hill Education.
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59-70. DOI: 10.1111/ene.13439.
- Lesourd, M., Le Gall, D., Baumard, J., Croisile, B., Jarry, C., & Osiurak, F. (2013). Apraxia and Alzheimer's disease: review and perspectives. *Neuropsychology review*, 23(3), 234-256. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11065-013-9235-4>.
- Lhermitte, F., Pillon, B., & Serdaru, M. (1986). Human autonomy and the frontal lobes. Part I: Imitation and utilization behavior: A neuropsychological study of 75 patients. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 19(4), 326-334. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.410190404>.
- Libet, B. (1985). Unconscious cerebral initiative and the role of conscious will in voluntary action. *Behavioral and brain sciences*, 8(4), 529-539. DOI:10.1017/S0140525X00044903.
- Likeman, M., Anderson, V. M., Stevens, J. M., Waldman, A. D., Godbolt, A. K., Frost, C., ... & Fox, N. C. (2005). Visual assessment of atrophy on magnetic resonance imaging in the diagnosis of pathologically confirmed young-onset dementias. *Archives of neurology*, 62(9), 1410-1415. DOI: 10.1001/archneur.62.9.1410.
- Lindquist Martin A., Wager T., (2015) *Principles of fMRI*. Leanpub Editore.

- Lo Buono, V., Palmeri, R., Corallo, F., Allone, C., Pria, D., Bramanti, P., & Marino, S. (2020). Diffusion tensor imaging of white matter degeneration in early stage of Alzheimer's disease: a review. *International Journal of Neuroscience*, 130(3), 243-250. DOI: <https://doi.org/10.1080/00207454.2019.1667798>.
- Loeb C.W., Favale E., (2003) *Neurologia*, Vol.2. Società Editrice Universo.
- McShane, R., Westby, M. J., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, L. E., ... & Debarros, J. (2019). Memantine for dementia. *Cochrane database of systematic reviews*, (3). DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003154.pub6>.
- Mammarella I. C., Toso C., Pazzaglia F., Cornoldi C. (2008). BVS-Corsi. *Batteria per la valutazione della memoria visiva e spaziale*. Edizioni Erickson.
- Manzoni G.C., Torelli P., (2012) *Neurologia*. Società Editrice Esculapio.
- Marra, C., Gainotti, G., Scaricamazza, E., Piccininni, C., Ferraccioli, M., & Quaranta, D. (2013). The Multiple Features Target Cancellation (MFTC): an attentional visual conjunction search test. Normative values for the Italian population. *Neurological Sciences*, 34(2), 173-180. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10072-012-0975-3>.
- Martin, R., Griffith, H. R., Belue, K., Harrell, L., Zamrini, E., Anderson, B., ... & Marson, D. (2008). Declining financial capacity in patients with mild Alzheimer disease: A one-year longitudinal study. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 16(3), 209-219. DOI: <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318157cb00>.

- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack Jr, C. R., Kawas, C. H., ... & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 7(3), 263-269.
- McShane, R., Westby, MJ., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, LE., Maayan, N., Ware, J., Debarros, J. (2019). Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. DOI: 10.1002/14651858.CD003154.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- Measso, G., Cavarzeran, F., Zappalà, G., Lebowitz, B. D., Crook, T. H., Pirozzolo, F. J., ... & Grigoletto, F. (1993). The mini-mental state examination: Normative study of an Italian random sample. *Developmental neuropsychology*, 9(2), 77-85.
DOI: <https://doi.org/10.1080/87565649109540545>.
- Meltzoff, A. N., & Moore, M. K. (1977). Imitation of facial and manual gestures by human neonates. *Science*, 198(4312), 75-78. DOI: 10.1126/scienza.198.4312.75.
- Miall, R. C. (2003). Connecting mirror neurons and forward models. *Neuroreport* 14, 2135-2137. DOI: 10.1097/00001756-200312020-00001.
- Molenberghs, P., Cunnington, R., & Mattingley, J. B. (2012). Brain regions with mirror properties: a meta-analysis of 125 human fMRI studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(1), 341-349. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.004>.

- Molnar-Szakacs, I., Kaplan, J., Greenfield, P. M., & Iacoboni, M. (2006). Observing complex action sequences: the role of the fronto-parietal mirror neuron system. *Neuroimage*, 33(3), 923-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.07.035>.

- Monaco, M., Costa, A., Caltagirone, C., & Carlesimo, G. A. (2013). Forward and backward span for verbal and visuo-spatial data: standardization and normative data from an Italian adult population. *Neurological Sciences*, 34(5), 749-754. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1130-x>.

- Moretti, D. V. (2016). Neurophysiology in Alzheimer's Disease and Dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 153. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00153>.

- Nichols, E., Szoeke, C. E., Vollset, S. E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., ... & Murray, C. J. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(1), 88-106. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32281-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32281-5).

- Nikolac Perkovic, M., Pivac, N. (2019). Genetic Markers of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1192:27-52. DOI: 10.1007/978-981-32-9721-0_3.

- Oh, H., Gentili, R. J., Reggia, J. A., and Contreras-Vidal, J. L. (2012). Modeling of visuospatial perspectives processing and modulation of the fronto-parietal network activity during action imitation. Conf. Proc. *IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2551-2554. DOI: 10.1109/EMBC.2012.6346484.

- Pandey, S., & Sarma, N. (2015). Utilization behavior. *Annals of Indian academy of neurology*, 18(2), 235. DOI: 10.4103/0972-2327.150613.

- Pazzaglia P., (2008) *Clinica Neurologica*. Società Editrice Esculapio.

- Pelosin, E., Avanzino, L., Bove, M., Stramesi, P., Nieuwboer, A., & Abbruzzese, G. (2010). Action observation improves freezing of gait in patients with Parkinson's disease. *Neurorehabilitation and neural repair*, 24(8), 746-752.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1545968310368685>.

- Petrides, M., Tomaiuolo, F., Yeterian, E. H., & Pandya, D. N. (2012). The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. *Cortex*, 48(1), 46-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.07.002>.

- Porsteinsson, AP., Isaacson, RS., Knox, S., Sabbagh, MN., Rubino, I. (2021). Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimers Dis*, 8(3):371-386.
DOI: 10.14283/jpad.2021.23.

- Quattropiani, M. C., Lenzo, V., Armieri, V., & Filastro, A. (2018). The origin of depression in Alzheimer disease: a systematic review. *Rivista di psichiatria*, 53(1), 18-30. DOI: 10.1708/2866.28920.

- Rai, V. (2017). Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Alzheimer Disease Risk: a Meta-Analysis. *Mol Neurobiol*, 54(2):1173-1186.
DOI: 10.1007/s12035-016-9722-8.

- Rapcsak, S. Z., Crowell, S. C., & Rubens, A. B. (1989). Apraxia in Alzheimer's disease. *Neurology*, 39(5), 664-664. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.39.5.664>.

- Rattanachayoto, P., Tritanon, O., Laothamatas, J., & Sungkarat, W. (2012). Comparison of a mirror neuron system among elders with mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and no disease.
- Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., & Hyman, B. T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11(4), 575-580. DOI: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90070-8).
- Reisberg, B., Prichep, L., Mosconi, L., John, E. R., Glodzik-Sobanska, L., Boksay, I., ... & de Leon, M. J. (2008). The pre-mild cognitive impairment, subjective cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 4(1), S98-S108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.11.017>.
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 29(6), 613-627.
- Rizzolatti, G., Fogassi, L., & Gallese, V. *Specchio, neuroni*.
- Rizzolatti, G., & Craighero, L. J. A. R. N. (2004). The mirror-neuron system.
- Rousseaux, M., Rénier, J., Anicet, L., Pasquier, F., & Mackowiak-Cordoliani, M. A. (2012). Gesture comprehension, knowledge and production in Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 19(7), 1037-1044. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03674.x>
- Sacco, K., (2012) *Le Neuroimmagini. Nuove frontiere per lo studio del cervello umano in vivo*, Idelson-Gnocchi Editore.

- Santangelo, G., Siciliano, M., Pedone, R., Vitale, C., Falco, F., Bisogno, R., ... & Trojano, L. (2015). Normative data for the Montreal Cognitive Assessment in an Italian population sample. *Neurological Sciences*, 36(4), 585-591. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1995-y>.
- Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz C., Isaacson, R.S., Diaz Brinton, R., Mosconi, L. (2018). Female sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J. Prev Alzheimers Dis*, 5(4):225-230. DOI: 10.14283/jpad.2018.34.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189. DOI: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Sgandurra, G., Ferrari, A., Cossu, G., Guzzetta, A., Fogassi, L., & Cioni, G. (2013). Randomized trial of observation and execution of upper extremity actions versus action alone in children with unilateral cerebral palsy. *Neurorehabilitation and neural repair*, 27(9), 808-815. DOI: <https://doi.org/10.1177/1545968313497101>.
- Shao, H., Breitner, J. C., Whitmer, R. A., Wang, J., Hayden, K., Wengreen, H., ... & Zandi, P. P. (2012). Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology*, 79(18), 1846-1852. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318271f823.
- Sinigaglia, C., & Rizzolatti, G. (2006). *So quel che fai. Il cervello che agisce e i neuroni specchio*. Raffaello Cortina Editore.

- Slot, R. E., Sikkes, S. A., Berkhof, J., Brodaty, H., Buckley, R., Cavado, E., ... & van der Flier, W. M. (2019). Subjective cognitive decline and rates of incident Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease dementia. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 465-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.10.003>.

- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., ... & Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 7(3), 280-292. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.003.

- Starkstein, SE. (2014). Anosognosia in Alzheimer's disease: diagnosis, frequency, mechanism and clinical correlates. *Cortex*, 61:64-73. DOI: 10.1016/j.cortex.2014.07.019.

- Stebbins, G. T., & Murphy, C. M. (2009). Diffusion tensor imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Behavioural neurology*, 21(1, 2), 39-49. DOI: 10.3233/BEN-2009-0234.

- Strotzer, M. (2009). One century of brain mapping using Brodmann areas. *Clinical Neuroradiology*, 19(3), 179-186. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00062-009-9002-3>.

- Travniczek-Marterer, A., Danielczyk, W., Simanyi, M., & Fischer, P. (1993). Ideomotor apraxia in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 88(1), 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1993.tb04176.x>.

- Treccani, La scoperta dei neuroni specchio. URL: https://www.treccani.it/enciclopedia/neuroni-specchio_%28Enciclopedia-Italiana%29/.

- Umiltà, M. A., Kohler, E., Gallese, V., Fogassi, L., Fadiga, L., Keysers, C., & Rizzolatti, G. (2001). I know what you are doing: A neurophysiological study. *Neuron*, 31(1), 155-165. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00337-3).

- Verghese, J., Robbins, M., Holtzer, R., Zimmerman, M., Wang, C., Xue, X., & Lipton, R. B. (2008). Gait dysfunction in mild cognitive impairment syndromes. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(7), 1244-1251. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.01758.x>.

- Vogt, S., Buccino, G., Wohlschläger, A. M., Canessa, N., Shah, N. J., Zilles, K., ... & Fink, G. R. (2007). Prefrontal involvement in imitation learning of hand actions: effects of practice and expertise. *Neuroimage*, 37(4), 1371-1383.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.07.005>.

- Walker, A. E. (1940). A cytoarchitectural study of the prefrontal area of the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 73(1), 59-86.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.900730106>.

- Weintraub, S., Wicklund, A. H., & Salmon, D. P. (2012). The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4), a006171.
DOI: [10.1101/cshperspect.a006171](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006171).

- Zhu, L., Ploessl, K., Kung, HF. (2014). PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases. *Chem Soc Rev*, 43(19):6683-91.
DOI [10.1039/c3cs60430f](https://doi.org/10.1039/c3cs60430f).

