



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Psicologia Generale**

**Corso di laurea Magistrale in Neuroscienze e  
Riabilitazione Neuropsicologica**

**Tesi di laurea Magistrale**

**Il ruolo dei campi oculari frontali nel  
tagging inibitorio: uno studio con  
stimolazione magnetica transcranica**

**The role of the frontal eye fields in inhibitory tagging:  
a study with transcranial magnetic stimulation**

***Relatore***

**Prof. Gianluca Campana**

***Laureanda: Sofia Bigini***

***Matricola: 2082032***

Anno Accademico 2023/2024



## INDICE

1. Introduzione	
a. Introduzione allo studio.....	5
b. Attenzione visiva.....	7
c. Campi oculari frontali (FEF).....	9
d. Inhibitory tagging.....	12
e. MILO task.....	15
2. Stimolazione magnetica transcranica (TMS) e neuronavigazione.....	18
3. Scopo della tesi.....	27
4. Materiali e metodi	
a. Introduzione.....	29
b. Partecipanti.....	30
c. Strumenti.....	32
d. Setup sperimentale.....	35
e. Descrizione del compito sperimentale.....	36
f. Sicurezza e comfort.....	37
5. Fasi dell'esperimento.....	38
6. Risultati e discussione.....	42

Bibliografia



# 1. Introduzione

## a. Introduzione allo studio

Nel nostro studio, ci proponiamo di esplorare il ruolo dei campi oculari frontali (frontal eye fields - FEF) nel processo di tagging inibitorio durante l'esecuzione del Multi Item Localisation (MILO) task. Il MILO task è un compito comportamentale utilizzato per valutare l'attenzione visiva e la capacità di inibire gli stimoli precedentemente selezionati. Questo compito richiede ai partecipanti di individuare rapidamente la posizione di target multipli.

Il MILO task è stato sviluppato come una variante del compito di ricerca visiva classico e, rispetto ai tradizionali compiti di ricerca visiva, offre la possibilità di esaminare come il cervello gestisce gli stimoli visivi multipli e di valutare la capacità di ignorare gli stimoli precedentemente visualizzati.

I FEF sono noti per la loro importanza nel dirigere l'attenzione visiva e nel controllo dei movimenti oculari. Tuttavia, il loro ruolo specifico nel tagging inibitorio non è ancora completamente compreso. Ipotizziamo che i FEF siano coinvolti nell'inibizione selettiva delle localizzazioni visive precedenti, consentendo un'allocazione più efficiente dell'attenzione verso nuovi stimoli rilevanti.

Per testare questa ipotesi, abbiamo utilizzato la stimolazione magnetica transcranica (transcranial magnetic stimulation - TMS) per inibire temporaneamente l'attività dei FEF mentre i partecipanti eseguono il MILO task e osservare gli effetti sulle prestazioni comportamentali durante il compito.

Il nostro obiettivo principale è determinare se l'inibizione dei FEF tramite TMS influenzi l'efficacia del tagging inibitorio durante l'esecuzione del MILO task. Ovvero, se l'inibizione selettiva dei FEF comprometta la capacità dei partecipanti di ignorare gli stimoli precedenti e se ciò si traduca in una minore efficienza nell'allocazione dell'attenzione verso i nuovi stimoli.

In questo capitolo, esploreremo più a fondo il contesto teorico e metodologico del nostro studio sull'uso del MILO task e della TMS per indagare il ruolo dei FEF tagging inibitorio. Discuteremo le

implicazioni di questa ricerca e le potenziali direzioni future per lo studio dei meccanismi attentivi e delle funzioni dei FEF.

## b. Attenzione visiva

In letteratura è ampiamente riconosciuto come l'indirizzamento (o "biasing") delle aree visive durante l'aspettativa di stimoli rilevanti per il comportamento sia influenzato da regioni cerebrali frontoparietali. Tra queste troviamo due regioni cruciali, i campi oculari frontali (frontal eye fields - FEF) e il solco intraparietale (intraparietal sulcus - IPS), entrambi facenti parte della via dorsale. Le teorie secondo cui il sistema attentivo possa essere suddiviso dal punto di vista anatomico e funzionale in due network separati, quello dorsale e quello ventrale, sono state infatti recentemente supportate da evidenze empiriche derivanti dalle tecniche di neuroimaging (Vossel, Geng e Fink, 2014).

Il sistema ventrale frontoparietale, maggiormente lateralizzato nell'emisfero destro, sembra essere responsabile dell'individuazione di stimoli inattesi e dell'innescare degli spostamenti di attenzione. Include aree come la giunzione temporo-parietale (temporoparietal junction - TPJ) e la corteccia frontale ventrale (Ventral Frontal Cortex - VFC).

Il sistema dorsale sarebbe implicato nell'allocazione volontaria top-down dell'attenzione verso determinate posizioni o elementi. Comprende i campi oculari frontali, il solco intraparietale e il lobulo parietale superiore (superior parietal lobule - SPL) (Petersen e Posner, 2012).

Molto di ciò che sappiamo di questi network deriva da studi che hanno utilizzato la risonanza magnetica funzionale (functional Magnetic Resonance Imaging - fMRI) o la tomografia a emissione di positroni (positron emission tomography - PET) per analizzare i pattern di attivazione cerebrale che si manifestano quando i soggetti vedono, per due secondi, una freccia che li porta a dirigere l'attenzione covert (ovvero senza muovere gli occhi o la testa) verso una posizione nella parte periferica del campo visivo. Mentre le aree occipitali, legate all'analisi sensoriale, rispondono in modo transitorio alla freccia (cue), il solco intraparietale (IPS) e i campi oculari frontali (FEF) mostrano una risposta più sostenuta, indicando che queste regioni sono coinvolte nel controllare l'allocazione attentiva. Inoltre, queste aree sono implicate in altre forme di selezione visiva, che si

basano non solo sulla posizione degli oggetti, ma anche su altre caratteristiche, come forma e colore (Corbetta e Shulman, 2002).

Gli spostamenti dell'attenzione sono quindi mediati non soltanto da stimoli ambientali che attivano processi di tipo bottom-up, ma anche dalla cognizione, quindi da processi di tipo top-down. Per questo motivo, quando nell'ambiente viene ricercato un target, gli occhi tendono a spostarsi verso gli oggetti simili ad esso o verso punti dello spazio dove è più probabile che questo si trovi. È stato ipotizzato che il cervello crei delle mappe di salienza che contengono l'importanza relativa di ogni punto dello spazio, portando gli occhi a muoversi verso quello che risulta più saliente nella mappa. Tuttavia, dal momento che, se il target non viene trovato, è necessario continuare ad esplorare lo spazio, è necessario che sia presente un processo di inibizione successivo all'esplorazione di un certo oggetto o di un certo punto. Questo meccanismo è stato denominato da Posner e Cohen "inibizione di ritorno" (Posner e Cohen, 1984), e si basa su evidenze comportamentali secondo cui i tempi di reazione sono maggiori quando il target si trova in un punto dello spazio già esplorato precedentemente. Successivamente, meccanismi simili sono stati riscontrati anche in paradigmi diversi da quello di Posner, come in compiti di ricerca visiva.

Un concetto simile è quello di tagging inibitorio, che si riferisce allo stesso fenomeno ma studiato in contesti di ricerca che utilizzano item multipli. Ad esempio, nel compito di ricerca visiva noto come MILO (Multi Item Localization), il tagging inibitorio descrive come l'attenzione venga inibita verso oggetti o punti dello spazio che sono già stati esplorati. Questo è cruciale per permettere un'esplorazione efficiente dell'ambiente. L'inibizione di ritorno e il tagging inibitorio rappresentano quindi due meccanismi che operano per ottimizzare la ricerca visiva e la distribuzione dell'attenzione nello spazio.

### c. Campi oculari frontali (FEF)

I FEF (Figura 1), appartenenti all'area 6 di Brodmann (Schall, 1997), sono delle regioni situate nella parte posteriore del giro frontale mediale, relativamente piccole e associate al controllo oculomotorio. La prima descrizione di questa regione proviene da David Ferrier, che più di 150 anni fa la identificò come un'area la cui stimolazione elettrica causa movimenti della testa e degli occhi (Petit e Pouget, 2019).

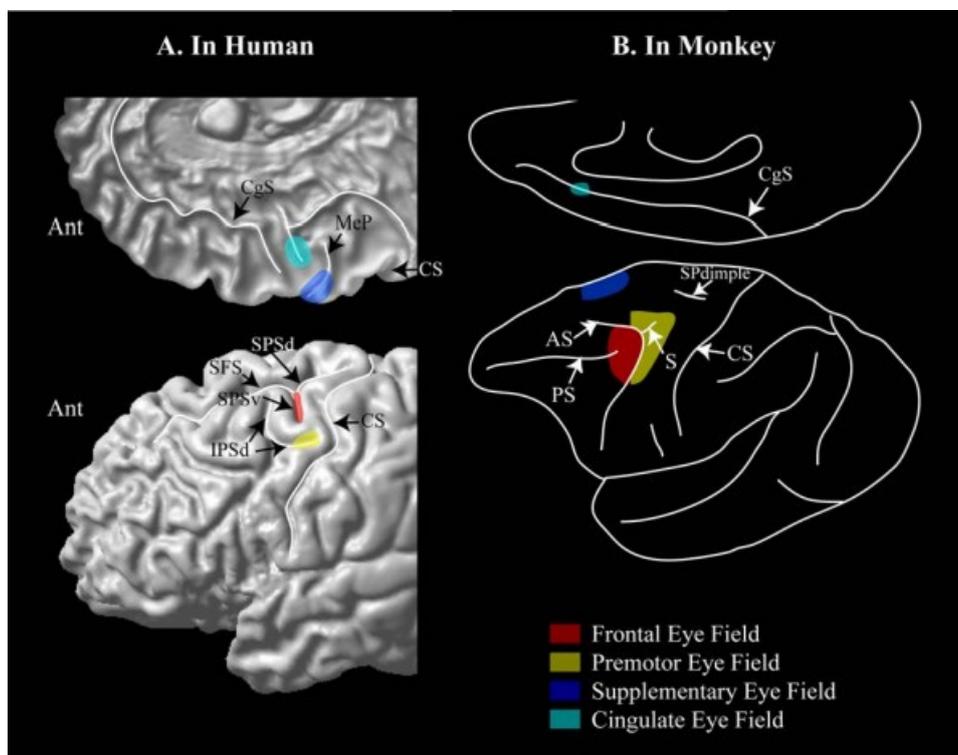


Figura 1- Localizzazione dei FEF rappresentati sulla superficie corticale dell'uomo (a sinistra) e della scimmia (a destra)- Amiez et al., 2009

Negli ultimi decenni quest'area è stata localizzata e studiata con diverse tecniche di neuroimaging, come il Diffusion tensor imaging (DTI), un metodo non invasivo utilizzato per identificare i circuiti di materia bianca calcolando la diffusione anisotropica delle molecole d'acqua. Un recente studio giapponese ha utilizzato proprio questa tecnica per indagare il network sottocorticale che parte dai campi oculari frontali in pazienti con epilessia focale. Dalla trattografia è emerso che le fibre

provenienti dai FEF discendono attraverso la capsula interna proiettandosi alla formazione reticolare pontina paramediana (paramedian pontine reticular formation - PPRF) controlaterale. Questa struttura è coinvolta nel controllo dei movimenti oculari orizzontali ed è collocata vicino al nucleo subtalamico (subthalamic nucleus - STN) e al globo pallido, facenti parte dei gangli della base, notoriamente coinvolti nel controllo motorio (Kimura et al., 2021).

Studi condotti su primati non umani hanno permesso di identificare tre tipi di cellule all'interno dei campi oculari frontali (Bruce e Goldberg, 1985):

- 1- Cellule visive: sono cellule che presentano risposte presaccadiche e rispondono a stimoli visivi in assenza di attività di movimento. Possono inoltre essere classificate a seconda della durata delle loro risposte. Quando questa è inferiore ai 100ms sono dette fasiche, mentre quelle con periodi di scarica superiori ai 100ms sono dette toniche.
- 2- Cellule motorie: si attivano prima del movimento oculare e sono legate a movimenti oculari volontari e la loro attività può variare a seconda di condizioni specifiche, come il tipo di stimolo visivo. Tuttavia, non si attivano necessariamente prima di tutti i movimenti oculari.
- 3- Cellule visuomotorie: mostrano attività sia in risposta a stimoli visivi ma in assenza di saccade (seppur la risposta sia minore), sia in situazioni di saccadi apprese ma in assenza di bersagli visivi. La loro attività inizia in seguito allo stimolo per compiere il movimento oculare e continua anche quando il soggetto effettivamente esegue il movimento.

Da diversi studi di neuroimaging è emerso che i FEF non sono legati solo al controllo motorio, ma sono coinvolti anche in compiti di attenzione spaziale (Petit e Pouget, 2019).

Il controllo dell'attenzione spaziale, che ci permette di processare le informazioni sensoriali importanti e di ignorare quelle potenzialmente distraenti, coinvolge infatti un network di aree corticali e sottocorticali. Nella corteccia, un ruolo centrale è proprio affidato ai FEF; alcuni studi condotti su primati non umani hanno dimostrato che, sia in questa regione, sia nel collicolo superiore (superior colliculus - SC) le risposte neuronali elicitate da stimoli visivi erano maggiori quando questi stimoli erano i target delle saccadi, supportando l'idea che vede una stretta relazione tra l'attenzione spaziale visiva e il controllo della direzione dello sguardo.

Nello specifico, i campi oculari frontali:

- 1- Rappresentano un'interfaccia che integra il sistema saccadico, che controlla i movimenti rapidi degli occhi, le rappresentazioni degli stimoli visivi delle cortecce posteriori e il controllo esecutivo a carico della corteccia prefrontale.
- 2- Regolano l'attenzione di tipo covert, che utilizziamo quando ci concentriamo su un oggetto senza spostare gli occhi. In particolare, questa funzione è regolata dai neuroni visivi e visuomotori, ma non da quelli di movimento oculare, che si attivano solo durante l'inizio di una saccade (Squire et al., 2013).

#### d. Inhibitory tagging

Il meccanismo di inhibitory tagging, o tagging inibitorio, consiste in una riduzione della risposta verso gli oggetti che in una scena sono già stati precedentemente osservati ed esplorati. Durante task complessi di ricerca visiva che includono pressione temporale e saccadi multiple, questo meccanismo permette di facilitare una selezione efficiente dei target (Conroy et al., 2024).

Il tagging inibitorio è stato dimostrato non solo a livello comportamentale, ma anche neuronale: da uno studio di Mirpour, Arcizet, Ong e Bisley del 2009 è infatti emerso come la risposta dei neuroni dell'area laterale intraparietale (lateral intraparietal area - LIP) fosse ridotta in risposta ad oggetti che erano già stati fissati. La capacità di inibire la revisione di posizioni precedentemente esplorate è un aspetto fondamentale del controllo attentivo. Questo meccanismo consente di evitare il ripetersi di errori e di garantire un'esplorazione più efficiente dell'ambiente circostante. Inibendo la revisione di posizioni già esplorate, il sistema attentivo può concentrarsi su nuove aree, aumentando così la probabilità di individuare nuovi stimoli o informazioni rilevanti.

In letteratura è noto il ruolo nel tagging inibitorio dei collicoli superiori, una struttura mesencefalica coinvolta nella selezione dei target durante task di ricerca visiva (Conroy et al., 2023). L'attività di questa regione è infatti minore quando lo stimolo nel campo visivo risulta precedentemente fissato durante un compito con saccadi ritardate, in cui alla scimmia viene richiesto di fissare nuovamente il bersaglio dopo un determinato intervallo di tempo (Shen e Parè, 2014). Questo effetto è più forte per quei neuroni dei collicoli superiori che hanno un ruolo nella selezione dei target. Questo suggerisce che la modulazione del processo di selezione a livello dei neuroni del SC possa fornire un meccanismo che supporti comportamenti di ricerca più efficienti (Conroy et al., 2024).

La presenza del meccanismo di tagging inibitorio porta ad ipotizzare che il cervello debba creare una rappresentazione degli oggetti già fissati in precedenza. Ad esempio, in un esperimento, ad un gruppo di macachi è stato somministrato un compito di delayed match/nonmatch to sample (Figura 2). In questo esperimento all'animale veniva presentato un elemento periferico durante un compito

di fissazione centrale. Successivamente l'elemento periferico spariva e un cue indicava se l'animale dovesse effettuare una saccade sulla posizione dell'elemento periferico mostrato in precedenza (match to sample) oppure su un altro elemento (nonmatch to sample). Questo è un compito cognitivo che richiede ai partecipanti di ricordare uno stimolo periferico di riferimento (sample) e confrontarlo con stimoli successivi che potevano apparire nella stessa posizione o posizioni differenti (match/nonmatch) dopo un certo periodo di tempo (delay). I risultati hanno mostrato come l'attività di un gruppo di neuroni dei FEF rispondesse selettivamente a stimoli "don't look", ovvero a stimoli su cui le scimmie non dovevano effettuare la saccade, dunque a stimoli che dovevano inibire. Questo dimostra che i FEF sono in grado di segnalare una soppressione attiva di una saccade mentre il partecipante ne esegue un'altra (Hasegawa et al., 2004).

Uno studio del 2019 di Mirpour condotto su due macachi ha indagato se la funzione dei neuroni di questa regione sia effettivamente quella di indicare dove guardare durante un compito di ricerca

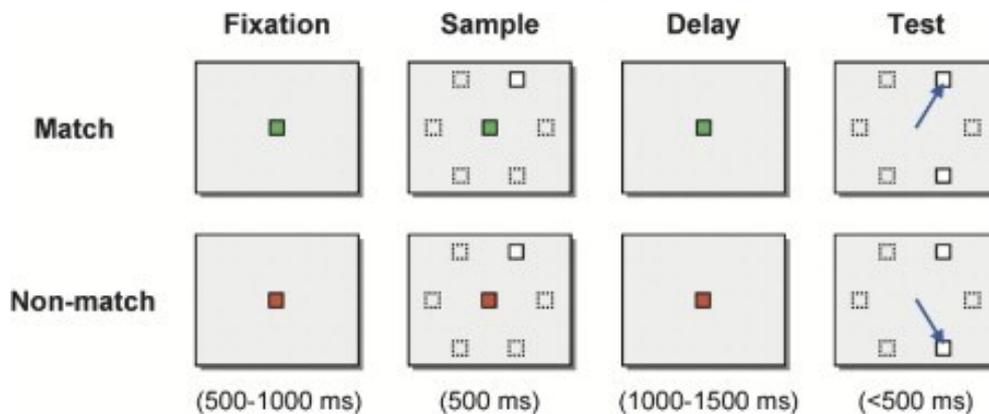


Figura 2- Esempio di compito delayed match/nonmatch to sample- Hasegawa et al., 2004.

visiva. Per verificare questa ipotesi sono stati registrati elettrofisiologicamente alcuni neuroni nei FEF durante un compito di ricerca esplorativa in cui apparivano cinque target e cinque distrattori. I risultati di questo studio hanno confermato le ipotesi sia attraverso i dati comportamentali, sia attraverso le risposte neurali. Dal punto di vista comportamentale, gli animali fissavano i target già esplorati precedentemente molto meno spesso e per tempi minori. Dal punto di vista neuronale, un sottogruppo di neuroni dei campi oculari frontali rispondeva maggiormente quando venivano fissati

stimoli già visti in precedenza e non mostrava soppressione della risposta durante fissazioni mantenute. Inoltre, le risposte di questi neuroni alla vista di stimoli già fissati non dimostrano variazioni significative in funzione di quanto tempo prima gli oggetti sono stati esplorati (Mirpour et al., 2019).

Gli autori hanno anche indagato come il segnale di tracciamento, cioè l'attività neurale che permette di mantenere anche durante i movimenti oculari le informazioni sull'oggetto che viene seguito con gli occhi, possa essere aggiornato durante i movimenti oculari. I neuroni studiati, chiamati neuroni di tracciamento (tracking neurons), indicano già prima della fine del movimento oculare se l'oggetto è stato fissato precedentemente oppure no, coerentemente con l'idea che aggiornino il segnale già durante la saccade. Tuttavia, sembra che questo meccanismo non derivi da un semplice remapping dell'attività dei neuroni di fissazione, ovvero una riorganizzazione dell'attività neurale dei FEF che permetta di aggiornare la rappresentazione spaziale del campo visivo dopo un movimento oculare. Nel complesso, lo studio suggerisce che i tracking neurons possano costituire un sottogruppo di neuroni dei campi oculari frontali con un ruolo caratteristico e delle proiezioni differenti rispetto agli altri neuroni della stessa regione. Secondo Mirpour et al. infatti, questi, piuttosto che ai centri di controllo oculomotori, fornirebbero dei feedback alla LIP per guidare l'inibizione riscontrata in diversi compiti (Mirpour et al., 2019).

#### e. MILO task

Tra i compiti in cui è stata riscontrata l'influenza del meccanismo di inhibitory tagging, un'evidenza molto robusta proviene dal Multi-Item Localization (MILO) task, un compito di ricerca visiva che, a differenza di altri paradigmi tradizionali in cui i soggetti danno risposte indirette verificando se un target sia presente o meno, richiede una risposta diretta ai soggetti, i quali devono cliccare direttamente con un mouse sui target in un certo ordine. L'uso di risposte dirette risulta più ecologico e simile al nostro modo di interagire tutti i giorni con gli oggetti che ci circondano (Meegan e Tipper, 1998). Inoltre, a differenza di altri paradigmi tradizionali, pone l'enfasi non solo sugli aspetti spaziali, ma anche su quelli temporali del comportamento. Questo task indaga infatti l'influenza di azioni passate e future sulla localizzazione attuale di target multipli. L'influenza delle azioni future può essere manipolata cambiando la posizione dei target successivi ogni volta che ne viene individuato uno, così da annullare ogni possibile pianificazione fatta in precedenza. Invece, l'influenza, minimizzata o massimizzata, delle azioni passate dipende dalla manipolazione della condizione "vanish/remain". Nella condizione remain, infatti, dopo aver cliccato sul target questo rimane presente sullo schermo; al contrario, nella condizione vanish il target sparisce dopo essere stato individuato. Questo tipo di paradigma permette di studiare diversi fenomeni, come quelli legati alla memoria di lavoro, alla selezione ed esecuzione della risposta, e soprattutto alla ricerca visiva necessaria per localizzare i target (Thornton e Horowitz, 2004).

I primi esperimenti che hanno utilizzato questo task seguivano tutti lo stesso metodo: inizialmente vi era una fase cue, in cui venivano presentati i target (lettere in ordine alfabetico oppure numeri in ordine crescente) che il soggetto poteva osservare finché non avesse deciso di iniziare la fase successiva, quella di ricerca (search). Nelle prime versioni del task, nella fase search oltre ai quattro target venivano presentati anche quattro distrattori (altre lettere o altri numeri). Lo scopo del soggetto è di localizzare gli item target e cliccare su di essi in ordine. Il trial termina nel momento in cui vengono localizzati tutti i target o quando viene commesso un errore. La variabile dipendente che viene analizzata è il tempo di reazione seriale (serial reaction time - SRT), che corrisponde alla

quantità di tempo impiegata per cliccare sul target  $n$ , a cui viene sottratto il tempo impiegato per cliccare sul target  $n-1$  ( $RT_n - RT_{n-1}$ ). Ogni trial porta quindi ad avere tanti valori di SRT quanti sono i target da localizzare. Il pattern formato da queste risposte diventa quindi il fattore su cui viene concentrata maggiormente l'attenzione durante le analisi (Thornton e Horowitz, 2004).

I pattern riscontrati nella variabile dipendente legati alla manipolazione vanish/remain sono stati replicati in molti studi differenti e hanno dimostrato come ricordiamo in modo quasi perfetto la posizione degli item selezionati precedentemente. Infatti, se i soggetti non ricordassero le posizioni precedentemente esplorate, i tempi di completamento del compito dovrebbero essere minori nella condizione vanish, dal momento che nel corso del suo svolgimento diminuisce il numero di target tra cui scegliere sullo schermo. Al contrario, come illustrato nella figura 3 proveniente dallo studio di Thornton e Horowitz del 2004, i SRT risultano simili nella condizione vanish e in quella remain (Figura 3).

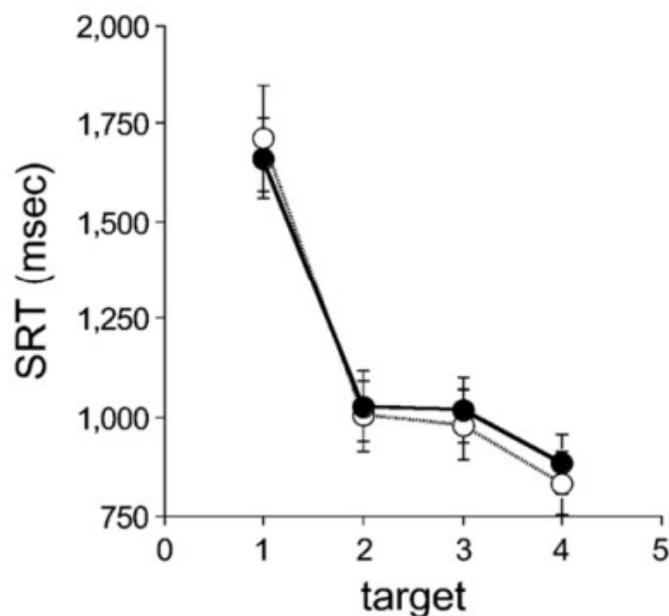


Figura 3- SRT dall'esperimento 1 di Thornton et al., 2004. I pallini pieni indicano la condizione remain, quelli vuoti la condizione vanish. Le barre d'errore indicano gli errori standard delle medie.

Infatti, i SRT tendono a ridursi man mano che si prosegue nel compito, dimostrando l'influenza del meccanismo di inhibitory tagging sulla prestazione dei soggetti.

Nel garantire l'efficacia di questo meccanismo i FEF potrebbero avere un ruolo fondamentale.

## 2. Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) e neuronavigazione

La stimolazione magnetica transcranica (transcranial magnetic stimulation – TMS) è un metodo indiretto e non invasivo di stimolazione cerebrale che, attraverso l'uso di un coil, permette di interagire con l'attività corticale.

I primi esperimenti che hanno utilizzato la stimolazione transcranica sugli umani risalgono al 1980, con l'uso della stimolazione elettrica (transcranial electrical stimulation - TES) ad opera di Merton e Morton. L'utilizzo di due elettrodi posti sulla corteccia motoria permise infatti di elicitarne un MEP (motor-evoked potential o potenziale motorio evocato) visibile attraverso l'elettromiografia (electromyography - EMG) (Wanalee et al., 2015). Cinque anni più tardi è stato Baker a proporre la sostituzione con la TMS, che utilizza il principio di induzione elettromagnetica scoperto da Faraday nel 1831 (Lefaucheur et al., 2019).

La TMS utilizza una bobina (coil), attraverso la quale passa una corrente elettrica che porta alla generazione di un impulso magnetico. L'impulso magnetico attraversa il cranio e giunge sulla corteccia generando una corrente elettrica, permettendo di modulare l'attività neuronale (Figura 4).

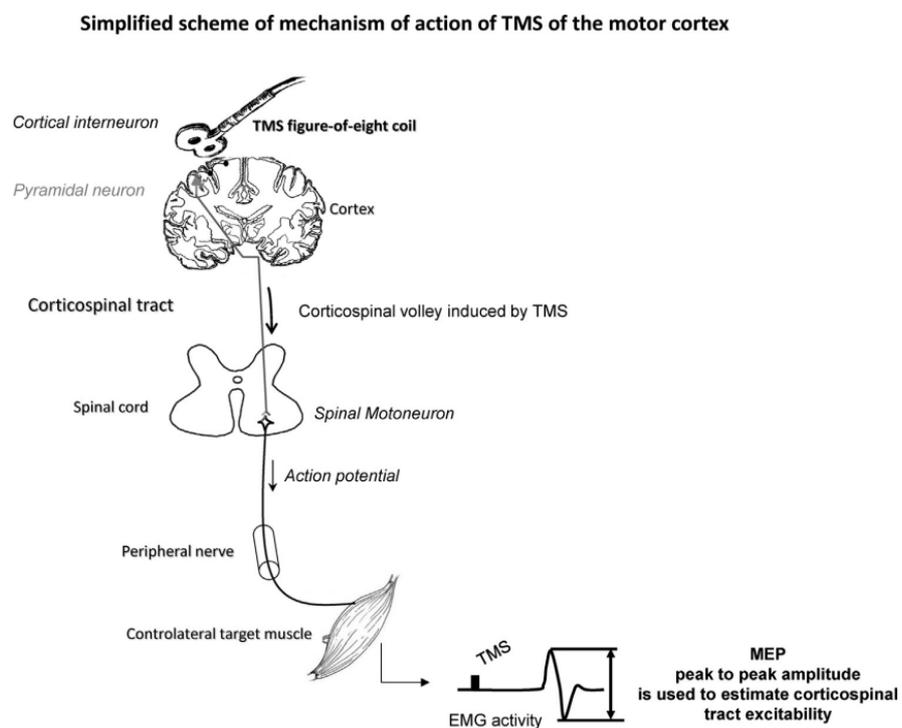


Figura 4- Schema del meccanismo di azione della TMS sulla corteccia motoria-  
Klomjai et al., 2015

Nonostante la forza del campo magnetico indotto dalla TMS venga ridotta da tessuti come il cranio e le meningi, viene comunque creata una corrente sufficiente a depolarizzare i neuroni superficiali, permettendo l'attivazione di porzioni circoscritte di corteccia.

La TMS, a causa della maggiore distanza dal coil della materia bianca e del fatto che l'impedenza della materia grigia è maggiore di quella bianca, causa però correnti più deboli a livello sottocorticale, permettendo così di stimolare soltanto le strutture corticali e non quelle più profonde come il talamo e i gangli della base (Wanalee et al., 2015).

Tramite la TMS si possono inoltre stimare l'eccitabilità corticale e corticospinale. Infatti, l'ampiezza picco-picco del MEP e la soglia motoria (motor threshold - MT), che corrisponde all'intensità minima che l'impulso TMS deve avere per evocare un MEP di almeno 50  $\mu$ V in circa il 50% di trials consecutivi (che possono variare da 5 a 10), sono entrambi parametri utili a stimarle.

La stimolazione può essere innanzitutto distinta in TMS online e offline. La prima viene somministrata in tempo reale durante un compito cognitivo o motorio. È utile per osservare gli effetti immediati della stimolazione sul funzionamento cerebrale. La seconda, invece, viene somministrata prima o dopo l'esecuzione di un compito cognitivo e motorio, valutando gli effetti più duraturi della plasticità cerebrale sulla prestazione cognitiva o motoria.

Per quanto riguarda la TMS offline, esistono diversi protocolli di stimolazione, ma i principali sono: TMS single pulse e repetitive TMS (repetitive transcranial magnetic stimulation - rTMS). In genere, la stimolazione single pulse viene utilizzata per esplorare il funzionamento di singole aree nel tempo (si parla infatti di neural chronometry), mentre quella ripetitiva (rTMS) è utilizzata per indurre cambiamenti nell'attività cerebrale che possano durare anche oltre il periodo di stimolazione (Wanalee et al., 2015), sfruttando fenomeni legati al potenziamento a lungo termine (long-term potentiation - LTP) e depressione a lungo termine (long-term depression - LTD).

Il meccanismo di LTP, scoperto agli inizi degli anni 70 e inizialmente osservato in vivo nelle cellule ippocampali dei conigli, è una forma di plasticità cerebrale attività dipendente che porta come risultato un aumento della trasmissione sinaptica. Il processo complementare è invece denominato depressione a lungo termine e porta ad una riduzione dell'efficacia della trasmissione sinaptica. Questi due meccanismi sono potenzialmente rilevanti per i processi di apprendimento e di memoria e, a livello molecolare, riguardano fenomeni simili. LTP e LTD si verificano infatti grazie a processi che coinvolgono i recettori NMDA e AMPA, e sono strettamente legati alla depolarizzazione indotta dalle molecole di calcio.

La LTP e la LTD possono essere indotte in diversi modi, ma uno dei più noti riguarda stimolazioni prolungate, rispettivamente ad alta e bassa frequenza (Bliss e Cooke, 2011).

Il percorso e la forza dei campi elettrici generati dalla TMS dipendono da molti fattori, sia biologici sia fisici. Per esempio, gli impulsi utilizzati possono essere di varia natura (monofasici o bifasici) e causare modulazioni differenti. Gli impulsi monofasici vengono solitamente utilizzati negli esperimenti che utilizzano protocolli single-pulse, mentre quelli bifasici vengono usati per la rTMS, stimolano in modo più intenso (Kammer et al., 2001) e tendono a colpire popolazioni meno omogenee di neuroni (Lefaucheur et al., 2019).

Altri fattori che influenzano la modulazione sono l'intensità e la frequenza della stimolazione o l'orientamento e la forma del coil. Quest'ultimo può infatti assumere forme geometriche diverse ed essere di varie dimensioni (Figura 5). Per esempio, i coil circolari, inducendo correnti diffuse, sono più indicati per stimolazioni di aree più ampie e superficiali. Il coil ad 8 permette invece stimolazioni più focali, dal momento che il campo elettrico è massimo sotto il cosiddetto hot-spot,

al centro del coil, permettendo anche di raggiungere strati corticali più profondi (Wanalee et al., 2015).



*Figura 5 - Tipi di coil utilizzabili per la stimolazione TMS- Lefaucheur et al., 2019*

La frequenza della stimolazione determina se la stimolazione avrà effetto inibitorio o eccitatorio.

Solitamente si ottengono effetti inibitori attraverso protocolli che utilizzano frequenze  $\leq 1\text{Hz}$ , mentre sono eccitatori i protocolli che stimolano a frequenze  $\geq 5\text{Hz}$  (Chen et al., 1997; Pascual-Leone et al., 1994).

Un altro strumento utile legato all'uso della TMS è la neuronavigazione (navigated brain stimulation - NBS), che utilizza una telecamera a infrarossi in grado di individuare dei tracker posizionati sul coil e sulla testa del soggetto. In questo modo, grazie ad una ricostruzione 3D del capo del partecipante, ottenuta grazie a template o a dati provenienti da scansioni di risonanza magnetica (magnetic resonance imaging – MRI), si può effettuare una stimolazione più affidabile delle aree interessate (Wanalee et al., 2015). La neuronavigazione presenta il vantaggio di

permettere una localizzazione più accurata delle aree da stimolare, oltre a consentire una personalizzazione basata sull'anatomia specifica del soggetto e ad aumentare il grado di sicurezza del procedimento, evitando di stimolare aree non desiderate.

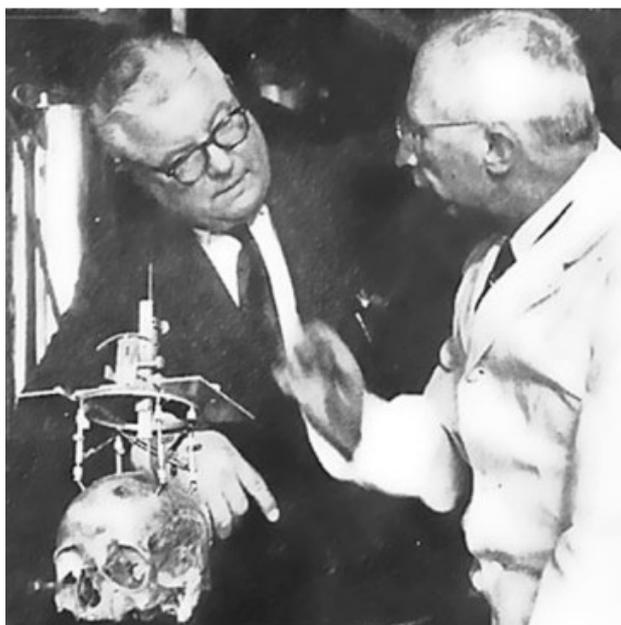
Le coordinate a cui ci si può riferire quando si sta individuando il sito di stimolazione possono essere coordinate MNI o Talairach.

La storia dello sviluppo dei sistemi di coordinate di cui disponiamo oggi inizia nel 1861, con la definizione fornita da Paul Broca dell'area responsabile dell'articolazione del linguaggio parlato in seguito ad un'analisi postmortem di pazienti con lesioni dell'emisfero sinistro (Broca, 1861) e prosegue con la scoperta dell'aria motoria primaria effettuata da Jackson solo due anni dopo (Reis et al., 2008).

In particolare, Broca, con la sua introduzione alla topografia cerebrale volta a fornire coordinate anatomiche durante le operazioni chirurgiche, ha contribuito all'evoluzione delle moderne neuroscienze. Ha infatti descritto le principali correlazioni cranio-cerebrali, che gli hanno permesso di svolgere con successo la prima craniotomia basata sulla localizzazione cerebrale.

Un successivo contributo rilevante alla topografia cranio-cerebrale è stato fornito da Turner e Reid, ma fu Robert Henry Clarke a presentare in modo accurato i principi della stereotassi accompagnati da un apparato conosciuto come Horsley-Clarke Device, basato su cervelli animali e sulla riproducibilità della relazione tra punti di riferimento situati sul cranio e strutture anatomiche del cervello. I punti stabiliti sul cranio sono diventati la base per lo sviluppo del sistema di coordinate stereotassico Cartesiano (Paxinos et al., 1998).

Il primo atlas stereotassico risale al 1952, quando, si è reso necessario lo sviluppo di un sistema più preciso in seguito all'applicazione alla neurochirurgia svolta su esseri umani dell'apparato di Horsley Clarke (Figura 6).



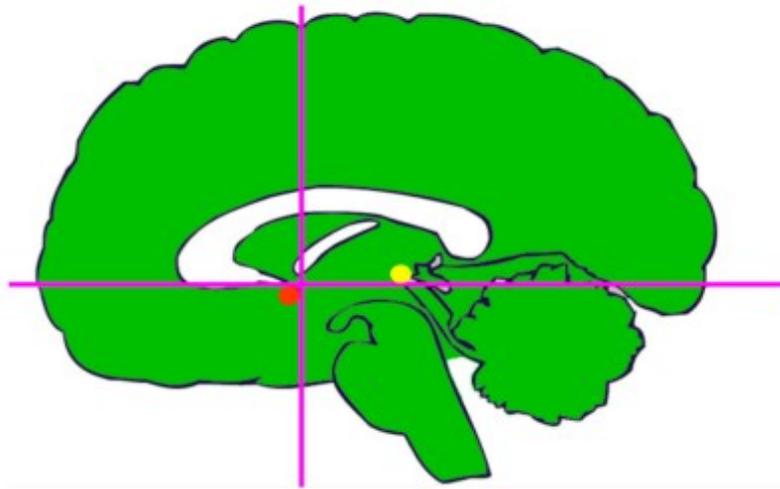
*Figura 6- Spiegel e Wycis con il loro apparato stereotassico-  
Gildenberg e Krauss, 2009.*

L'idea inizialmente fu di utilizzare come punto di riferimento la calcificazione della ghiandola pineale, visibile attraverso i raggi x, per arrivare alla definizione dello spazio intracranico. Questa fu però abbandonata a causa dell'eccessiva variabilità spaziale riscontrata, non compatibile con procedure precise come quelle che si volevano svolgere. Per questo motivo, al posto della ghiandola pineale il primo atlante utilizzò la cosiddetta linea CP-PO, che connetteva il centro della commissura posteriore (posterior commissure - PC) con il solco pontomidollare (Spiegel et al., 1952).

Già nel 1962 era però più comunemente utilizzata la linea che unisce la commissura anteriore con quella posteriore (anterior commissure-posterior commissure - AC-PC line, Figura 7), grazie al lavoro di Jean Talairach (Spiegel et al., 1962).

Lo strumento stereotattico inventato da Talairach era relocabile e utilizzava per la localizzazione una doppia griglia, integrando angiografia e ventricolografia. Fu probabilmente lo strumento più avanzato nell'epoca precedente alla tomografia computerizzata. Un passaggio chiave fu dimostrare

che i nuclei funzionali profondi mantenevano una relazione costante con la linea AC-PC e con i piani verticali, mediani e orizzontali derivati da essa.



*Figura 7- Linea intercommissurale, che passa tra il punto rosso e quello giallo.*

L'adattamento del cervello al template secondo il sistema di Talairach si basa sulla linea AC-PC per quanto riguarda la dimensione che va dalla parte anteriore a quella posteriore, mentre per gli assi laterali e caudali dipende dalle dimensioni della corteccia cerebrale. La tecnica consisteva quindi nel disegnare il diagramma di Talairach direttamente sui ventricologrammi del paziente, così da ricostruire un template in scala da cui derivare le coordinate stereotattiche.

Il sistema di coordinate Talairach-Tournoux, pubblicato nel 1988 è stato il più utilizzato nell'ambito della TMS (Talairach et al., 1988). Questo utilizza un sistema di griglie proporzionale in tre dimensioni. Dal momento che tra cervelli diversi possono essere presenti differenze nella distanza tra determinati punti, Talairach e Tournoux dividono il cervello in cubi chiamati parallelogrammi ortogonali (Figura 8).

Ogni emisfero viene diviso in 9 porzioni in lunghezza, 4 in larghezza e 12 in altezza. In questo caso, ogni voxel non rappresenta una distanza rigida rispetto ad un'altra area del cervello, bensì una determinata proporzione.

Tuttavia, nonostante la griglia proporzionale sia una tecnica di normalizzazione comoda, presenta dei limiti. Infatti, la presenza di alcune incongruenze, come il fatto che la tavola coronale dell'atlante non includa la commissura anteriore, può portare alla generazione di errori nell'identificazione dei punti di riferimento e nel posizionamento della griglia.

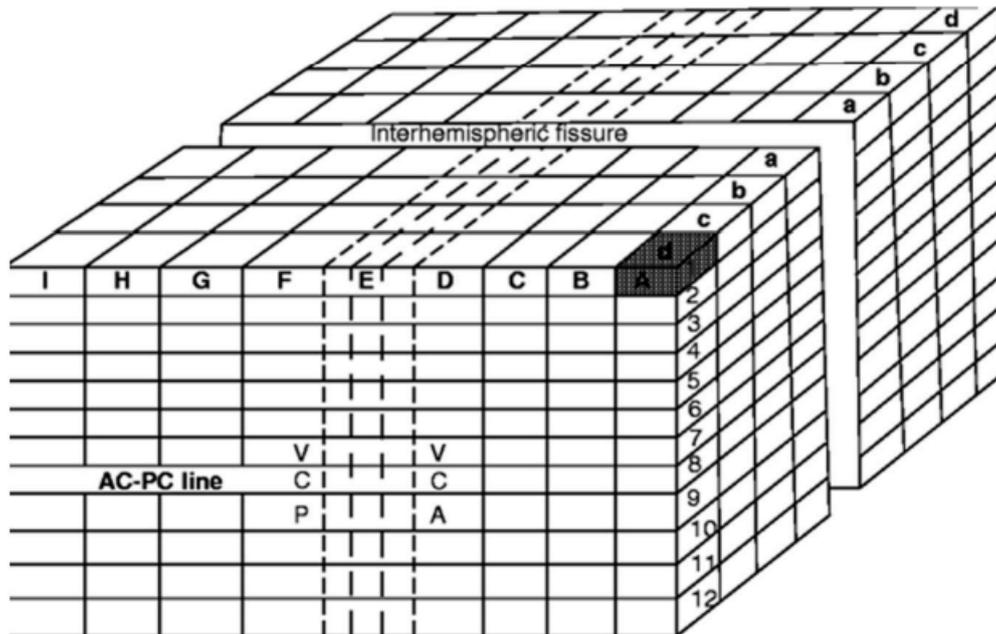


Figura 8- Spazio Talairach, rappresentato da prismi ortogonali rettangolari.

Per questo motivo, è stato successivamente proposto il sistema Talairach-Nowinski, che permette un'identificazione più accurata dei punti di riferimento localizzati sulla corteccia. Questi sono definiti su tre piani: uno intercommissurale e due coronali che passano per le due commissure. Per aumentare la precisione del modello sono state introdotte diverse linee intercommissurali, quella centrale, quella tangenziale e quella interna. La distanza intercommissurale interna fornisce una precisione più alta, soprattutto per quanto riguarda le strutture subcorticali, mentre quelle centrali e tangenziali hanno errori relativi molto più alti (Conti et al., 2023).

Le coordinate MNI (Montreal Neurological Institute) sono state formulate nel 1995 a partire dalla definizione di un template basato su numerose scansioni di risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging - MRI). Lo scopo dell'Istituto Neurologico di Montreal era quello di definire un

cervello standard che fosse più rappresentativo della popolazione rispetto all'atlas Talairach. Per fare ciò, sono state utilizzate 250 scansioni su cui sono stati individuati manualmente i punti di riferimento che individuavano la linea AC-PC; successivamente, ognuna delle scansioni è stata ridimensionata secondo il modello Talairach, permettendo così di ottenere 250 atlanti. In seguito, ne sono stati aggiunti altri 55, arrivando a un totale di 305 atlanti, di cui 239 provenienti da cervelli di uomini e 66 da donne, con un'età media di  $23,4 \pm 4,1$  anni.

Benché le coordinate MNI305 siano state definite basandosi sul template di Talairach e Tournoux, esse sono significativamente diverse dalle coordinate di quest'ultimo. Tuttavia, presentano comunque limiti legati alla risoluzione spaziale delle scansioni MRI e all'assenza di alcuni dettagli, come nel caso della corteccia cerebellare.

Sei anni più tardi, nel 2001, l'Istituto Neurologico di Montreal ha creato il template MNI-152, basandosi su 152 risonanze magnetiche 3D e utilizzando sempre come coordinate di riferimento quelle di Talairach e Tournoux. Questa volta, però, il template è stato costruito grazie all'uso di algoritmi necessari per allineare le immagini delle risonanze magnetiche con l'immagine target. Il vantaggio di questo template riguarda il fornire maggiori dettagli della parte più alta del cervello e della porzione inferiore del cervelletto (Mandal et al., 2012). Oggi le coordinate MNI risultano le più utilizzate per la localizzazione di aree corticali.

La stimolazione magnetica transcranica, permettendo di modulare l'attività neuronale in modo non invasivo, è uno strumento utile per osservare gli effetti di attivazione ed inibizione corticale sul comportamento e sui processi cognitivi. Nello specifico, è una tecnica che può risultare utile per alcuni compiti, permettendo di studiare il coinvolgimento di alcune aree cerebrali nei processi cognitivi, offrendo un'opportunità unica per comprendere le funzioni specifiche di suddette regioni.

### 3. Scopo della tesi

Il sistema visivo svolge un ruolo fondamentale nel plasmare i nostri processi attentivi, permettendoci di interagire con il mondo circostante e fornendoci capacità essenziali e altamente adattive. Tra queste, la capacità di dare priorità alle informazioni più rilevanti, filtrando i distrattori, risulta cruciale per rispondere efficacemente agli stimoli in tempo reale.

Lo scopo di questo studio è di indagare più approfonditamente la modulazione attentiva, con particolare riferimento all'inibizione dell'attenzione verso specifiche zone dello spazio, noto come "tagging inibitorio". Questo fenomeno è stato oggetto di numerosi studi e continua a rappresentare un campo di ricerca attivo.

Uno degli strumenti utilizzati per esaminare il tagging inibitorio è il Multi Item Localization (MILO) task. Questo compito, che coinvolge la ricerca visiva di target multipli, consente di studiare se i soggetti inibiscono l'esplorazione delle aree dello spazio già viste in precedenza. La variabile di interesse, in questo contesto, è il tempo di reazione seriale (Serial Reaction Times, SRT). In presenza del tagging inibitorio, i SRT tendono a decrescere progressivamente, poiché le porzioni dello spazio già esplorate non vengono fissate nuovamente.

Considerando la complessità del circuito neurale che sottende l'attenzione visiva, è essenziale approfondire la comprensione del contributo delle diverse regioni cerebrali coinvolte. Questo studio si focalizza sul ruolo dei campi oculari frontali (FEF) nell'inibizione attentiva.

Una delle tecniche utilizzate per studiare il ruolo specifico delle aree cerebrali, sfruttando la plasticità cerebrale, è la stimolazione magnetica transcranica (TMS). In questo studio, i soggetti sono stati sottoposti a una sessione di stimolazione magnetica mirata a ridurre l'eccitabilità corticale dell'area FEF. Per questo scopo, è stato scelto un protocollo di stimolazione a 1Hz, somministrato per 25 minuti, noto per i suoi effetti inibitori.

L'ipotesi della ricerca è che, se i FEF sono effettivamente implicati nel meccanismo di tagging inibitorio, una riduzione della loro attività si rifletterà sulla prestazione dei soggetti, misurata attraverso i tempi di reazione seriale (SRT) registrati durante l'esecuzione del compito MILO.

## 4. Materiali e Metodi

### a. Introduzione

In questa sezione vengono descritti nel dettaglio i materiali e i metodi utilizzati per condurre questo studio sull'inibizione attentiva mediata dai campi oculari frontali (FEF), utilizzando il MILO task e la stimolazione magnetica transcranica (TMS). Le informazioni fornite riguardano i partecipanti, gli strumenti, le procedure sperimentali e dettagli circa la raccolta e l'analisi dei dati.

## b. Partecipanti

Hanno partecipato a questo studio 12 soggetti con vista normale o corretta. A livello medico, ai partecipanti era richiesto che ci fosse assenza di disturbi neurologici o psichiatrici, nessuna storia di epilessia o altre condizioni che controindicassero l'uso della TMS (svenimento o sincope, traumi cranici diagnosticati o associati a perdite di coscienza, problemi di udito o acufeni, problemi cerebrovascolari o cerebropatie, impianti cocleari o biostimolatori, stato di gravidanza, inserti metallici a livello cerebrale o in altre parti del corpo, neurostimolatori cerebrali o nella colonna vertebrale, pace maker cardiaco, dispositivi per la microinfusione di farmaci, assunzione di alcuni tipi di farmaci).

Il rispetto di questi criteri è stato verificato tramite la somministrazione di un questionario allegato al consenso informato al trattamento con TMS.

Inoltre, era necessaria la disponibilità a partecipare a tutte le sessioni dello studio e che non vi fossero state partecipazioni recenti ad altri studi che prevedevano l'uso della TMS.

Tutti i partecipanti avevano dai 19 ai 25 anni ed erano così suddivisi: 7 femmine e 5 maschi.

Tutti hanno firmato un modulo di consenso informato prima di iniziare lo studio. Il modulo forniva una descrizione della ricerca, includendo sia lo scopo dello studio, sia quello delle future raccolte dati volte ad indagare anche il ruolo dell'IPS nel meccanismo di tagging inibitorio. Inoltre, comprendeva informazioni circa le procedure sperimentali, quindi le varie fasi di cui l'esperimento era composto, i potenziali rischi e i diritti dei partecipanti, incluso quello di ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento.

Era inclusa nel consenso informato una sezione specifica per la stimolazione magnetica transcranica volta a spiegare quale sia il meccanismo d'azione della TMS, con particolare riferimento a quella ripetitiva, e ad illustrare i rischi in cui si può incorrere durante la stimolazione.

Venivano inoltre descritti gli strumenti, il luogo e la durata della ricerca e infine i recapiti del responsabile dello studio.

I partecipanti sono stati reclutati tramite annunci presso l'Università degli Studi di Padova e sui social media.

Per la loro partecipazione, i soggetti hanno ricevuto un compenso economico erogato dall'Università degli Studi di Padova al termine della terza sessione sperimentale.

Lo studio è stato condotto in conformità con le linee guida etiche internazionali per la ricerca con soggetti umani e ha ricevuto l'approvazione dal comitato etico dell'università. Oltre alla raccolta dei consensi informati, sono state rese tutte le misure necessarie a garantire l'anonimato e la riservatezza dei dati dei partecipanti.

### c. Strumenti

Gli strumenti utilizzati erano quelli necessari per lo svolgimento del compito, per la somministrazione della TMS e per la corretta localizzazione dell'area da stimolare.

Per lo svolgimento del MILO task è stato utilizzato un monitor 24 pollici con risoluzione 1920x1080 pixel. Il soggetto era posto ad una distanza dallo schermo di 68,5 cm.

Per la somministrazione della TMS è stato utilizzato il macchinario Magstim Rapid 2 (Figura 9) con una bobina a forma di 8. Questa veniva posizionata sopra i campi oculari frontali (FEF) o sopra Cz utilizzando la neuronavigazione.



*Figura 9- Strumento utilizzato per la TMS (Magstim Rapid 2)*

Per la localizzazione dei FEF ci si è riferiti alle seguenti coordinate MNI152, localizzate all'interno del giro precentrale (Bedini et al., 2023):

FEF emisfero sinistro= x -26; y -6; z 54

FEF emisfero destro= x 30; y -6; z 50

Il protocollo prevedeva una stimolazione a bassa frequenza (1Hz) per 25 minuti, per un totale di 1500 impulsi.

Per la neuronavigazione è stato utilizzato Brainsight 2.x, un software image-based necessario per il posizionamento del coil durante l'uso della TMS che permette di personalizzare in modo rapido una sessione di neuronavigazione con la TMS, selezionando le coordinate dell'area che si vuole stimolare.

Per individuare l'area di interesse sullo scalpo del partecipante vengono utilizzati diversi strumenti, tra cui una fascetta da posizionare intorno allo scalpo del partecipante, un puntatore e il sistema Polaris (Figura 10).



*Figura 10-Monitor con software, sferette riflettenti e sistema Polaris*

Questi strumenti vengono utilizzati per individuare una serie di punti di riferimento (landmarks): Nasion, inion, trago destro e sinistro, punti più anteriori, posteriori, di destra, di sinistra e superiori del cranio per permettere di adattare la MRI del template a forma e dimensioni del cranio di ciascun partecipante.

I landmarks vengono toccati dal ricercatore attraverso l'uso del puntatore e sono utilizzati per mappare la struttura della testa del partecipante.

Il puntatore e la posizione della testa del soggetto vengono individuati, grazie alle sferette, dal sistema Polaris, che calcola in tempo reale la loro posizione nello spazio. In questo modo viene creata una mappa virtuale della testa del partecipante, permettendo di stimare dove sia opportuno stimolare per agire su determinate aree della corteccia. Questa stima è particolarmente accurata quando per ogni soggetto sperimentale sono disponibili i dati MRI, altrimenti si ricorre all'uso di template.

Utilizzando il software Brainsight è possibile calibrare il coil così che anche questo possa essere individuato dalla Polaris e, di conseguenza, che durante la stimolazione si possa stimare quale sia la sua posizione rispetto a quella della testa del partecipante.

#### d. Setup sperimentale

L'esperimento è stato svolto all'interno del laboratorio TMS del dipartimento di Psicologia Generale dell'Università degli Studi di Padova.

All'interno della stanza, la luce ambientale era debole e costante durante tutte le sessioni sperimentali.

I partecipanti erano posizionati a una distanza fissa dal monitor di 68,5cm grazie all'ausilio di una mentoniera regolabile per mantenere la posizione stabile e confortevole.

e. Descrizione del compito sperimentale

Ai soggetti era richiesto lo svolgimento del MILO task. Questo era suddiviso in una fase di prova composta da 4 trial, seguita da due blocchi di 32 trial. Questi erano misti, presentavano quindi sia la condizione Vanish sia quella Remain. Nella condizione vanish ogni target spariva dopo essere stato individuato, mentre in quella remain restava presente sulla schermata.

Ogni trial era composto da una schermata contenente 8 target, costituiti da pallini rossi dal diametro di 85 pixel con il centro bianco contenenti ognuno un numero da 1 a 8. Tutti gli stimoli venivano presentati in contemporanea in ordine casuale sullo schermo.

La durata di ogni trial era variabile, dal momento che gli stimoli permanevano sullo schermo fino al completamento del trial o al compimento di un errore. Alla fine di ogni trial appariva una schermata che forniva un feedback sulla prova appena svolta.

Ai partecipanti era richiesto di cliccare sui target sulla base del numero contenuto nella pallina, in ordine crescente da 1 a 8. I soggetti dovevano quindi identificare la posizione dei target conseguenti il più rapidamente possibile attraverso l'utilizzo di un mouse.

Venivano registrati i tempi di reazione (Reaction times – RTs) a partire dai quali è possibile ottenere i Serial Reaction times (SRTs), calcolando la differenza delle medie dei RTs necessari per individuare ogni target in ciascun trial.

f. Sicurezza e comfort

Per la somministrazione della TMS sono state adottate delle misure di sicurezza; innanzitutto veniva svolto uno screening preliminare, per valutare l' idoneità dei partecipanti attraverso questionari che raccoglievano informazioni mediche.

Inoltre, venivano forniti tappi per le orecchie per proteggere dall' eventuale rumore generato dalla TMS.

Per ridurre l' affaticamento dei partecipanti, tra i due blocchi dell' esperimento era prevista una breve pausa. Inoltre, i soggetti potevano scegliere quando iniziare il compito, sia nella fase pre-stimolazione, sia nella ripetizione del task post-stimolazione.

Inoltre, l' ambiente era controllato di modo che la temperatura e la ventilazione fossero adeguate a mantenere un clima confortevole.

## 5. Fasi dell'esperimento

Ognuna delle tre sessioni sperimentali era così organizzata:

- Prima dell'arrivo del soggetto vengono preparati gli strumenti necessari, tra cui: metro, cuffia, computer, macchinario per la stimolazione e attrezzatura per la neuronavigazione. Inoltre, il coil viene calibrato prima di ogni sessione, così da essere certi che la posizione che viene rilevata rispetto alla testa del soggetto sia affidabile.
- Accoglienza del soggetto: raccolta del consenso informato del partecipante, dei suoi dati anagrafici e accertamento dell'idoneità a sottoporsi alla sessione di stimolazione magnetica.

- Individuazione dell'intensità della stimolazione che verrà effettuata:

Per lo svolgimento di questa fase è innanzitutto necessario individuare la corteccia motoria primaria (M1) situata in corrispondenza del giro precentrale per elicitare i Motor Evoked Potentials (MEP) attraverso impulsi TMS.

Al partecipante viene fornita una cuffia che faciliti l'individuazione dei punti di interesse.

Viene innanzitutto individuato Cz, uno dei punti del sistema internazionale 10-20 che corrisponde al punto centrale sulla sommità del cranio. Si trova all'intersezione della linea mediana sagittale (che va dalla parte anteriore a quella posteriore del cranio) e la linea coronale (che va da un orecchio all'altro). Per trovarlo si cerca l'intersezione tra le due linee individuata calcolando la metà della distanza tra nasion einion e tra trago destro e trago sinistro.

A partire da Cz, in caso il partecipante sia destrimane, ci si sposta di 3cm verso sinistra per trovare l'area motoria primaria e cercare di individuare il punto ottimale di stimolazione, che permette di ottenere i MEP di ampiezza maggiore. Viene quindi chiesto al soggetto di posizionare la mano destra con il palmo rivolto verso l'alto e di esercitare una leggera

pressione tra pollice e medio, così da facilitare l'attivazione del muscolo abditore breve del pollice (Abductor Pollicis Brevis - APB), situato nella parte laterale del palmo della mano e responsabile del movimento che allontana il pollice da essa, perpendicolarmente al palmo.

Per verificare che il punto individuato sullo scalpo corrisponda effettivamente alla corteccia motoria primaria, viene posizionata la bobina TMS e viene somministrato un primo impulso con un'intensità di partenza del 65%.

In caso di attivazione del muscolo, il soggetto può aprire la mano, così che si possa trovare la soglia motoria a riposo. Questa corrisponde all'intensità di stimolazione che porta il muscolo ad attivarsi (con ampiezza maggiore di 50  $\mu$ V) in seguito a circa il 50% delle stimolazioni a riposo.

Nella successiva stimolazione l'intensità impostata sul macchinario per la TMS corrisponderà al 90% della soglia motoria a riposo.

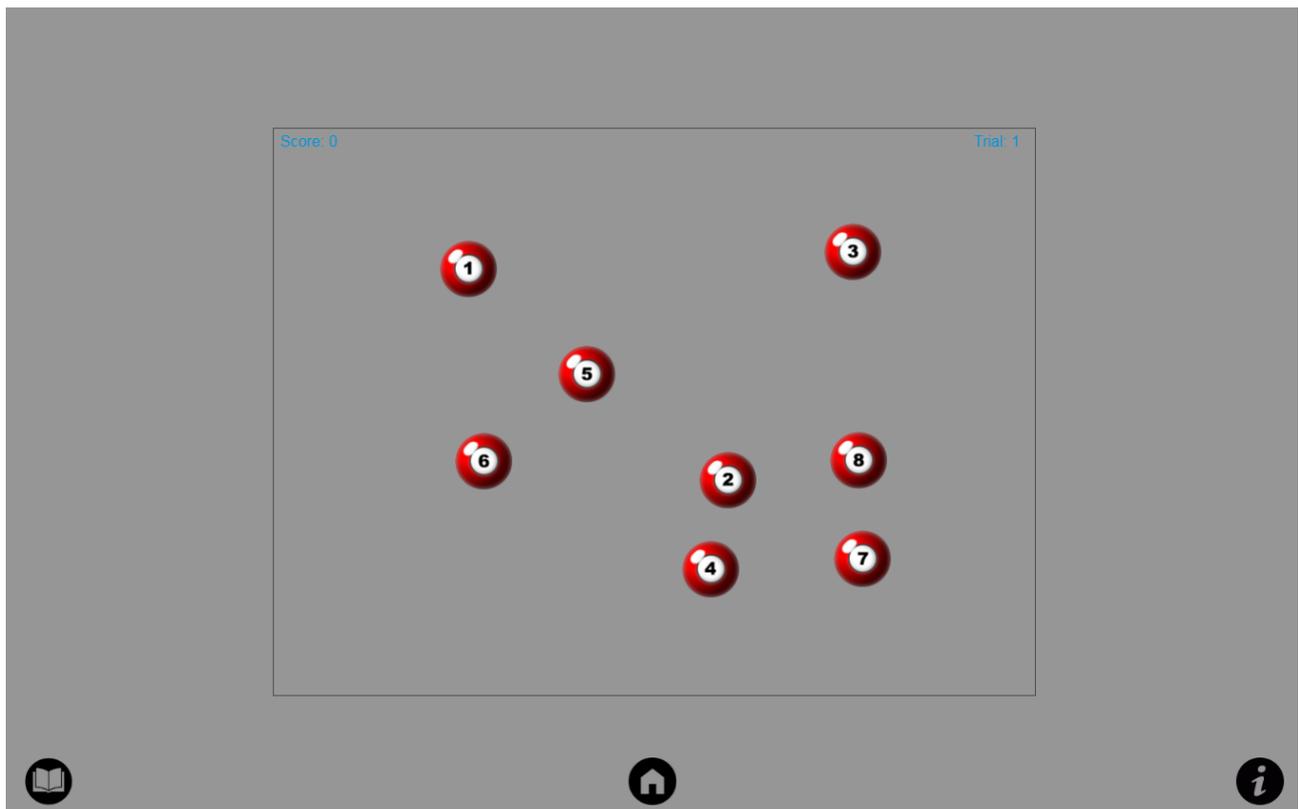
In caso il soggetto sia mancino, la procedura è la medesima, ma a partire da Cz viene individuata l'area motoria primaria (M1) di destra e si va a stimolare il muscolo abditore breve del pollice sinistro.

- La fase successiva all'individuazione della soglia motoria prevede che il soggetto svolga il compito MILO.

Il partecipante viene fatto accomodare su una sedia stabile con la testa poggiata su una mentoniera che permette di mantenere il volto ad una distanza fissa dallo schermo di 68,5cm. L'altezza della mentoniera viene regolata così da garantire la massima comodità possibile.

Viene preparata la schermata per lo svolgimento del task selezionando la cartella dove verranno conservati i dati relativi ai RT in ogni trial.

Questa schermata contiene le indicazioni per il soggetto, in cui viene spiegato che il partecipante dovrà selezionare i target in un certo ordine e che saranno presenti due blocchi. Viene inoltre anticipata al soggetto la presenza delle due condizioni, quella vanish e quella remain. Oltre ad un'anticipazione di quello che il soggetto vedrà durante il compito (Figura 11), al partecipante è richiesto di rispondere in modo ordinato nel minor tempo possibile.



*Figura 11-Esempio di trial*

I primi quattro trial sono di prova, così che il soggetto si possa esercitare in entrambe le condizioni; i due blocchi contengono le due condizioni sperimentali presentate in ordine randomizzato.

Al soggetto è richiesto di completare i due blocchi, con una pausa tra di essi per riposarsi.

- Dopo lo svolgimento del blocco pre-stimolazione del task, viene utilizzato il software di neuronavigazione per individuare il sito da stimolare. Viene quindi posizionata la fascetta

sulla testa del partecipante e vengono identificati i landmarks necessari per la ricostruzione del cranio del soggetto attraverso l'uso del puntatore. La procedura di neuronavigazione viene applicata soltanto durante le due sessioni che prevedono la stimolazione di uno dei due FEF. Quando invece è Cz ad essere stimolato, il sito viene individuato utilizzando un metro, come avviene durante l'individuazione della soglia motoria.

- Inizia ora la fase di stimolazione. Il soggetto posiziona nuovamente la testa sulla mentoniera così da limitare il più possibile i movimenti. Il coil, grazie all'ausilio di un apposito braccio, viene fissato in corrispondenza del punto del cranio che permette la stimolazione dell'area di interesse secondo il software di neuronavigazione o secondo le misurazioni effettuate con il metro. Quando il braccio con il coil è fissato nel punto esatto, viene avviato il protocollo di stimolazione sul software Matlab. La stimolazione ha una durata di 25 minuti e, con un impulso al secondo, permette di somministrare 1500 impulsi.
- In seguito alla fine della stimolazione, al soggetto viene nuovamente chiesto di completare i quattro trial di prova e i due blocchi da 32 trial del MILO task. Questa fase si articola in modo analogo a quella che precede la stimolazione e permette di confrontare la prestazione del soggetto prima e dopo la sessione di TMS.

## 6. Risultati e discussione

Sono state condotte tre analisi della varianza (analysis of variance – ANOVA) a misure ripetute per esaminare le differenze nei SRT dei partecipanti a ciascun item successivo. Abbiamo scelto di considerare tre fattori entro i soggetti: il numero di item della serie, la condizione vanish vs. remain, e il fattore tempo pre vs. post stimolazione.

L'analisi ha rivelato che il numero di item è un fattore significativo in tutte e tre le ANOVA: sia nella condizione stimolazione su Cz ( $F(6,66)= 49.986, p < .001, \eta^2 = 0.675$ ), sia su lFEF ( $F(6, 66) = 34.122, p < .001, \eta^2 = 0.541$ ), sia su rFEF ( $F(6, 66) = 23.947, p < .001, \eta^2 = 0.491$ ). Questi dati indicano che i tempi di reazione diminuivano sempre all'aumentare del numero di item della serie. L'assenza di interazione, per ognuna delle aree stimolate, tra il fattore numero di item e la condizione vanish vs. remain (Cz:  $F(6,66)=1,499, p=0,192$ ; lFEF:  $F(6,66)=1,400, p=0,228$ ; rFEF:  $F(6,66)=1,471, p=0,202$ ) indicherebbe la presenza di tagging inibitorio dal momento che i tempi di risposta non variano significativamente tra la condizione vanish e quella remain (Figure 12, 13 e 1).

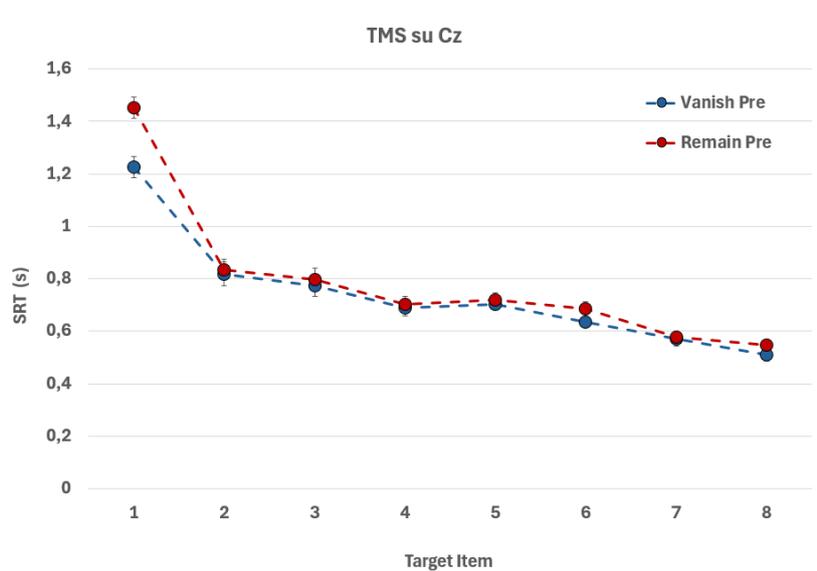


Figura 12- Grafico a linee che rappresenta SRT nella condizione pre-stimolazione di Cz. I SRT diminuiscono all'aumentare del numero di item. L'asse x si riferisce al numero di item. L'asse y alla media dei SRT.

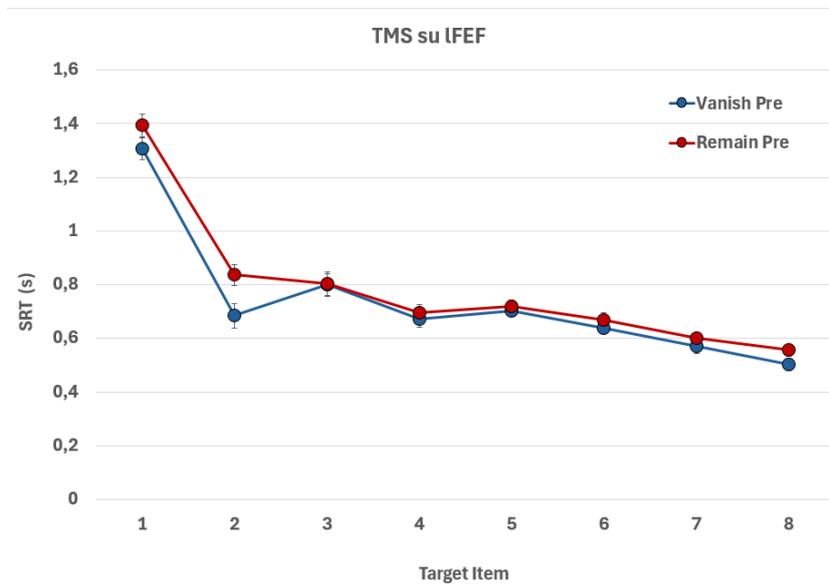


Figura 113-Grafico a linee che rappresenta SRT nella condizione pre-stimolazione di IFEF. I SRT diminuiscono all'aumentare del numero di item. L'asse x si riferisce al numero di item. L'asse y alla media dei SRT.

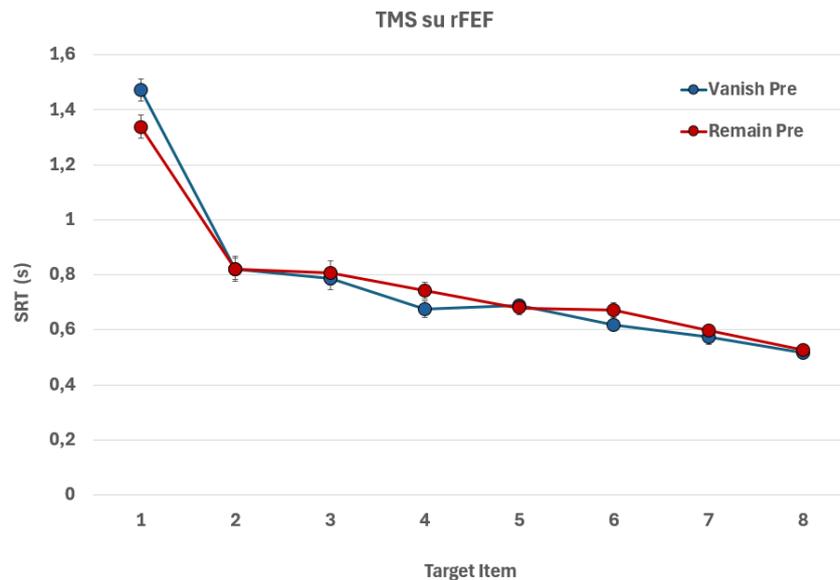


Figura 14-Grafico a linee che rappresenta SRT nella condizione pre-stimolazione di IFEF. I SRT diminuiscono all'aumentare del numero dell'item. L'asse x si riferisce al numero di item. L'asse y alla media dei SRT.

Per quanto riguarda la condizione vanish vs remain, la condizione vanish è mediamente più veloce rispetto alla condizione remain sia nella sessione in cui è stato stimolato Cz ( $F(1, 11) = 10.732, p = 0.007, \eta^2 = 0.012$ ) sia in quella in cui sono stati stimolati i IFEF ( $F(1, 11) = 28.401, p < .001, \eta^2 = 0.025$ ), mentre si osserva una tendenza verso la significatività nella sessione in cui sono stati stimolati i rFEF ( $F(1, 11) = 4.487, p = 0.058, \eta^2 = 0.003$ ). Questo potrebbe indicare una maggiore

facilità nel localizzare gli item quando questi spariscono dalla schermata ad ogni selezione successiva.

L'analisi ha indicato che il fattore tempo (pre vs. post) è significativo su Cz ( $F(1, 11) = 5.489, p = 0.039, \eta^2 = 0.006$ ), con il compito post stimolazione che mostra tempi di risposta leggermente più veloci rispetto al pre stimolazione, suggerendo un possibile effetto pratica. Tuttavia, su IFEF ( $F(1, 11) = 0.013, p = 0.911$ ) e rFEF ( $F(1, 11) = 0.951, p = 0.350$ ), il fattore tempo non è risultato significativo.

Non ci sono state interazioni significative tra pre vs. post stimolazione e il numero di item, né tra pre vs. post stimolazione e la condizione vanish vs. remain. Tuttavia, c'è una tendenza verso la significatività nell'interazione pre vs. post \* vanish vs. remain \* numero di item nella sessione di stimolazione dei IFEF ( $F(6, 66) = 2.050, p = 0.071, \eta^2 = 0.010$ ).

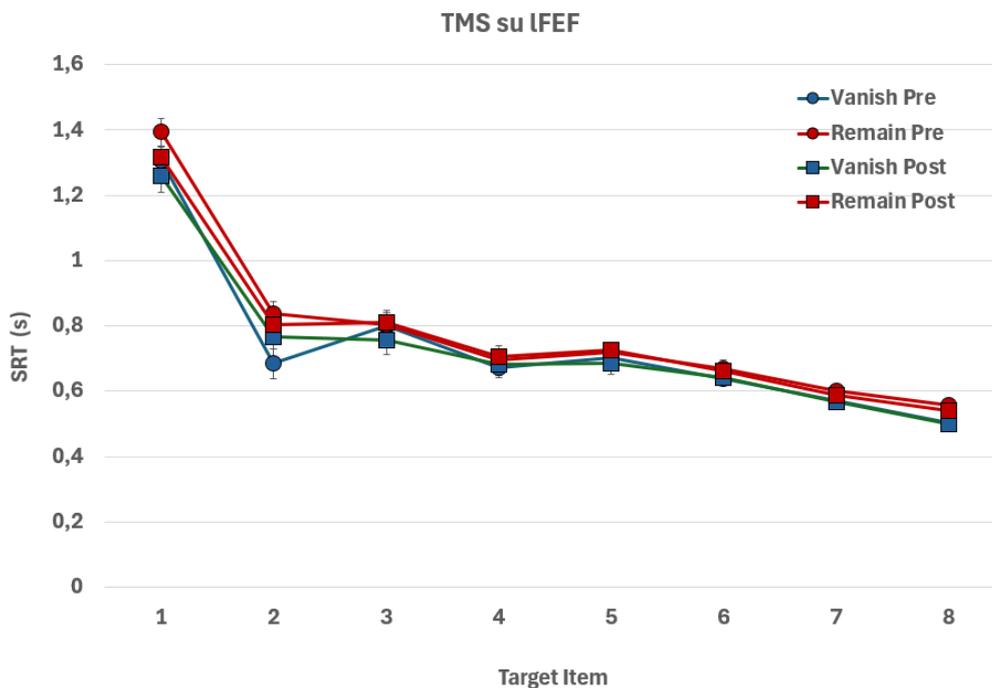


Figura 15- Grafico a linee che mostra le variazioni dei SRT in relazione al numero di item pre e post stimolazione su IFEF sia nella condizione vanish sia in quella remain. L'asse x si riferisce al numero di item. L'asse y alla media dei SRT.

Osservando i grafici, questa tendenza sembra più essere dovuta a variazioni nei SRT nei primi item che a variazioni negli ultimi item. Variazioni nei primi item non possono essere indicative di differenze nel tagging inibitorio. Nella condizione remain sembra esserci una piccola differenza nei SRT medi tra le condizioni pre e post stimolazione. Tuttavia, tale differenza, se anche fosse significativa, indicherebbe SRT più veloci (e quindi un tagging inibitorio più efficiente) nella condizione post stimolazione, non supportando la nostra ipotesi sperimentale, secondo cui l'inibizione dei FEF potesse portare ad una peggiore efficienza del meccanismo del tagging inibitorio, con SRT più lenti negli ultimi item della serie nella condizione remain post stimolazione.

Analizzando i risultati delle analisi svolte sulle slope non emergono effetti significativi della stimolazione TMS sul meccanismo dell'inhibitory tagging. Nei IFEF, non sono stati riscontrati effetti significativi nelle slope tra vanish e remain ( $F(1, 11) = 1.040, p = 0.330$ ) o tra pre e post stimolazione ( $F(1, 11) = 1.154, p = 0.306$ ) (Figura 16).

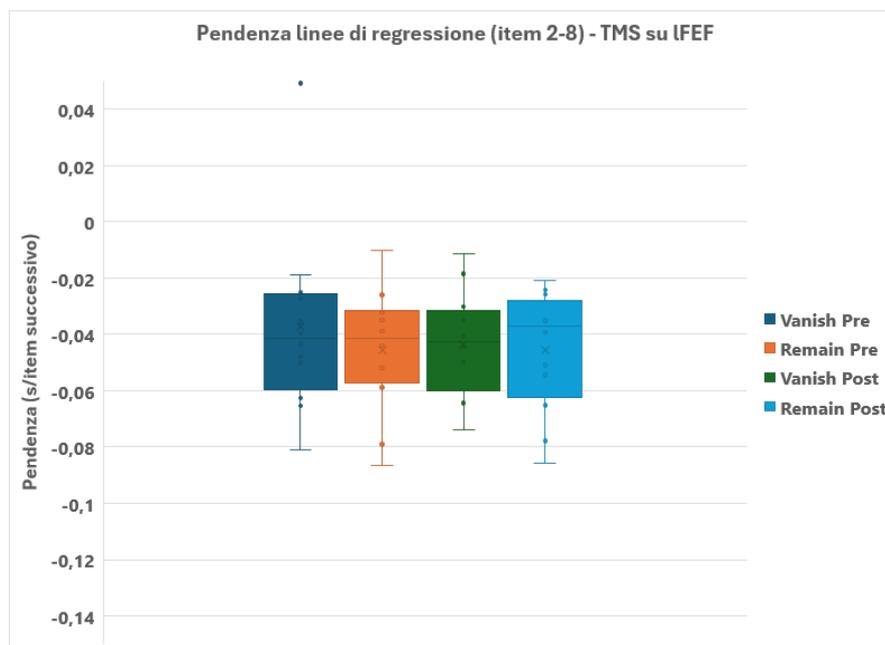


Figura 16- Grafico dell'analisi delle pendenze della linea di regressione su IFEF. Sull'asse y è indicata la pendenza, mentre le 4 scatole rappresentano la condizione vanish e quella remain pre e post stimolazione.

Nei rFEF, non sono state trovate differenze significative nelle slope tra le condizioni vanish e remain ( $F(1, 11) = 0.046, p = 0.834$ ), ma solo una tendenza alla significatività tra le condizioni pre e post stimolazione ( $F(1, 11) = 3.724, p = 0.080$ ) (Figura 17).

La tendenza alla significatività riscontrata nei rFEF potrebbe derivare da variazioni nei tempi di risposta ai primi item piuttosto che a miglioramenti nell'inibizione delle risposte agli ultimi.

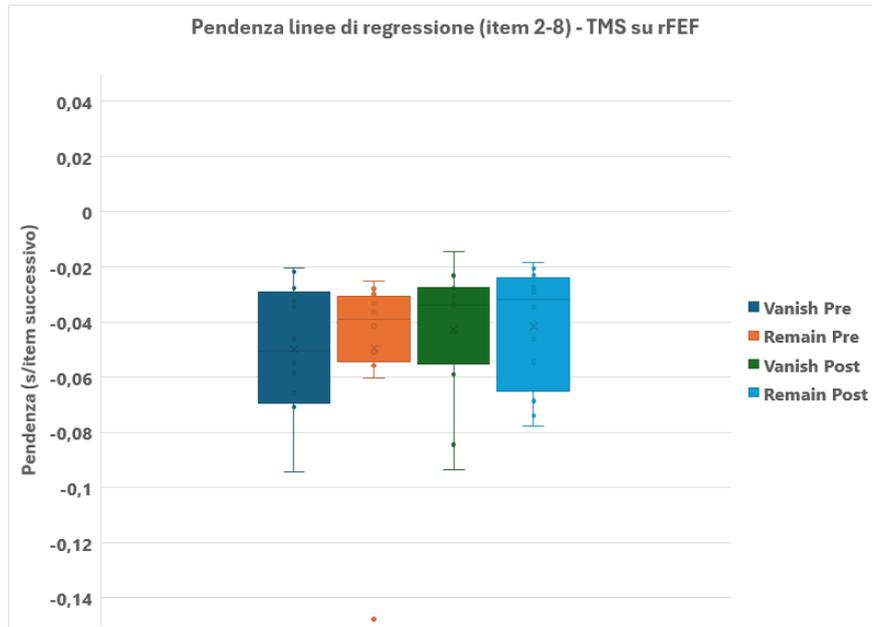


Figura 17- Grafico dell'analisi delle pendenze della linea di regressione su rFEF. Sull'asse y è indicata la pendenza, mentre le 4 scatole rappresentano la condizione vanish e quella remain pre e post stimolazione.

La localizzazione senza l'uso delle MRI dei singoli partecipanti potrebbe non essere stata sufficientemente accurata, portando alla stimolazione di aree diverse da quelle di interesse. Questo potrebbe aver influenzato i risultati delle analisi, limitando la capacità di rilevare effetti significativi. In alternativa, il meccanismo del tagging inibitorio potrebbe risiedere altrove o potrebbe essere una proprietà di un intero network, come il fronto-parietal attentional network, piuttosto che di una singola area cerebrale.

Questi risultati suggeriscono che, mentre ci sono effetti chiari del numero di item e della condizione vanish vs. remain sui tempi di risposta, l'assenza di interazioni significative e di effetti nelle analisi delle pendenze indica che il tagging inibitorio potrebbe non essere influenzato dalla TMS nelle aree studiate. È possibile che ulteriori ricerche con una localizzazione più precisa tramite MRI e un'analisi di network più ampia potrebbero fornire una maggiore comprensione di questi meccanismi.

## Bibliografia

- Amiez, C., & Petrides, M. (2009). Anatomical organization of the eye fields in the human and non-human primate frontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 89(2), 220-230.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.07.010>
- Bedini, M., Olivetti, E., Avesani, P., & Baldauf, D. (2023). Accurate localization and coactivation profiles of the frontal eye field and inferior frontal junction: an ALE and MACM fMRI meta-analysis. *Brain Structure & Function*, 228(3-4), 997–1017.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-023-02641-y>
- Bliss, T. V., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(Suppl 1), 3–17.  
<https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001300002> Broca, P. About the articulation language site. *Bull. Soc. Anth.* 1861, 6, 330–357, 398–407
- Bruce CJ, Goldberg ME. Primate frontal eye fields. I. Single neurons discharging before saccades. *J Neurophysiol.* 1985 Mar;53(3):603-35. doi: 10.1152/jn.1985.53.3.603. PMID: 3981231.
- Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, Hallett M, Cohen LG. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology.* 1997 May;48(5):1398-403. doi: 10.1212/wnl.48.5.1398. PMID: 9153480.
- Conroy, C., Nanjappa, R., & McPeck, R. M. (2023). Inhibitory tagging in the superior colliculus during visual search. *Journal of Neurophysiology*, 130(4), 824–837.  
<https://doi.org/10.1152/jn.2023.09.20.558470>
- Conroy, C., Nanjappa, R., & McPeck, R. M. (2024). Inhibitory tagging both speeds and strengthens saccade target selection in the superior colliculus during visual search. *bioRxiv*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1101/2023.09.20.558470>

- Conti, A., Gambadauro, N. M., Mantovani, P., Picciano, C. P., Rosetti, V., Magnani, M., ... Giannini, G. (2023). A brief history of stereotactic atlases: Their evolution and importance in stereotactic neurosurgery. *Brain Sciences*, 13(5), 830.  
<https://doi.org/10.3390/brainsci13050830>
- Corbetta M, Shulman GL. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Mar;3(3):201-15. doi: 10.1038/nrn755. PMID: 11994752.\
- Gildenberg, P. L., & Krauss, J. K. (2009). History of the stereotactic societies. In A. M. Lozano, P. L. Gildenberg, & R. R. Tasker (Eds.), *Textbook of stereotactic and functional neurosurgery* (pp. xx-xx). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69960-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69960-6_2)
- Hasegawa, R. P., Peterson, B. W., & Goldberg, M. E. (2004). Prefrontal neurons coding suppression of specific saccades. *Neuron*, 43(3), 415-425.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.013>
- Kammer, T., Beck, S., Thielscher, A., Laubis-Herrmann, U., & Topka, H. (2001). Motor thresholds in humans: A transcranial magnetic stimulation study comparing different pulse waveforms, current directions and stimulator types. *Clinical Neurophysiology*, 112(2), 250-258. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(00\)00513-7](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(00)00513-7)
- Kimura, Y., Enatsu, R., Yokoyama, R., Suzuki, H., Sasagawa, A., Hirano, T., ... Mikuni, N. (2021). Eye movement network originating from frontal eye field: Electric cortical stimulation and diffusion tensor imaging. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*, 61(3), 219-227. <https://doi.org/10.2176/nmc.oa.2020-0306>
- Klomjai, W., Katz, R., & Lackmy-Vallée, A. (2015). Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 58(4), 208-213. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.05.005>

- Klomjai, W., Katz, R., & Lackmy-Vallée, A. (2015). Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 58(4), 208-213. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.05.005>
- Lefaucheur, J. P. (2019). Transcranial magnetic stimulation. In H. T. *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 160, pp. 559-580). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00037>
- Mandal, P. K., Mahajan, R., & Dinov, I. D. (2012). Structural brain atlases: design, rationale, and applications in normal and pathological cohorts. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(Suppl 3), S169-S188. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120412>
- Mirpour, K., Arcizet, F., Ong, W. S., & Bisley, J. W. (2009). Been there, seen that: A neural mechanism for performing efficient visual search. *Journal of Neurophysiology*, 102(6), 3481-3491. <https://doi.org/10.1152/jn.00688.2009>
- Mirpour, K., Bolandnazar, Z., & Bisley, J. W. (2019). Neurons in FEF keep track of items that have been previously fixated in free viewing visual search. *The Journal of Neuroscience*, 39(11), 2114-2124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1767-18.2018>
- Pascual-Leone, A., Valls-Solé, J., Wassermann, E. M., & Hallett, M. (1994). Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain*, 117(Pt 4), 847-858. <https://doi.org/10.1093/brain/117.4.847>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). Academic Press.
- Petersen, S. E., & Posner, M. I. (2012). The attention system of the human brain: 20 years after. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 73-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150525>
- Petit, L., & Pouget, P. (2019). The comparative anatomy of frontal eye fields in primates. *Cortex*, 118, 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.02.023>

- Posner, M., & Cohen, Y. (1984). Components of visual orienting. In M. I. Posner & M. E. Raichle (Eds.), *Attention and performance X: Control of language processes* (pp. 531-). Erlbaum.
- Reis, C., Sankar, T., Crusius, M., Zabramski, J., Deshmukh, P., Rhoton, A. J., Spetzler, R., & Preul, M. (2008). Comparative study of cranial topographic procedures: Broca's legacy toward practical brain surgery. *Neurosurgery*, 62(2), 294-310.
- Schall, J. D. (2015). Visuomotor functions in the frontal lobe. *Annual Review of Vision Science*, 1, 469-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035317>
- Shen, K., & Paré, M. (2014). Predictive saccade target selection in superior colliculus during visual search. *The Journal of Neuroscience*, 34(16), 5640-5648. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3880-13.2014>
- Spiegel, E., & Wycis, H. (1952). *Stereoencephalotomy, thalamotomy and related procedures. I. Methods and stereotaxic atlas of the human brain*. Grune and Stratton.
- Spiegel, E., & Wycis, H. (1962). *Stereoencephalotomy. II. Clinical and physiological applications*. Grune and Stratton.
- Squire, R. F., Noudoost, B., Schafer, R. J., & Moore, T. (2013). Prefrontal contributions to visual selective attention. *Annual Review of Neuroscience*, 36, 451-466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150439>
- Talairach, J., & Tournoux, P. (1988). *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain: 3-dimensional proportional system: An approach to cerebral imaging*. Thieme.
- Thornton, I. M., & Horowitz, T. S. (2004). The multi-item localization (MILO) task: Measuring the spatiotemporal context of vision for action. *Perception & Psychophysics*, 66(1), 38–50. <https://doi.org/10.3758/BF03194859>

- Thornton, I. M., & Horowitz, T. S. (2020). Searching through alternating sequences: Working memory and inhibitory tagging mechanisms revealed using the MILO task. *i-Perception*, 11(5), Article 2041669520958018. <https://doi.org/10.1177/2041669520958018>
- Vossel, S., Geng, J. J., & Fink, G. R. (2014). Dorsal and ventral attention systems: Distinct neural circuits but collaborative roles. *Neuroscientist*, 20(2), 150-159. <https://doi.org/10.1177/1073858413494269>