



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO
IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

TESI DI LAUREA

**RISPOSTE MOTORIE IN DROSOPHILA
MELANOGASTER A STIMOLI VISIVI
TIPO RANDOM DOTS KINEMATOGRAM**

**MOTOR RESPONSES IN DROSOPHILA
MELANOGASTER TO RANDOM DOTS
KINEMATOGRAM VISUAL STIMULI**

Relatore: Prof. Aram Meghian

Correlatore: Dott. Matteo Bruzzone

Laureando: Gabriele Carriglio

Matricola: 1192709

Anno accademico: 2021-2022

*“E un ridere rauco
e ricordi tanti
e nemmeno un rimpianto”*

Fabrizio De André

Ai miei genitori.

INDICE

1. RIASSUNTO	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 IL SISTEMA NERVOSO	3
2.2 LA CORTECCIA CEREBRALE	4
2.2.1 AREE CORTICALI ASSOCIATIVE	5
2.2.2 LE FUNZIONI CEREBRALI SUPERIORI	5
2.3 L'APPRENDIMENTO	6
2.4 LA MEMORIA	7
2.4.1 LA MEMORIA ICONICA	9
2.5 SENSAZIONE E PERCEZIONE	10
2.6 L'APPARATO VISIVO	11
2.6.1 L'ATTENZIONE VISIVA	13
2.6.2 FUNZIONI DELL'ATTENZIONE VISIVA	14
2.6.3 L'ATTENZIONE VISIVA SPAZIALE	15
2.7 I MOVIMENTI OCULARI	17
2.7.1 TIPI DI MOVIMENTI OCULARI	18
2.8 RANDOM DOTS MOTION KINEMATOGRAM	21
2.8.1 DIFFERENZE TRA BAMBINI, ADULTI E ANZIANI NEI KRDM	24
2.8.2 CAMPI D'UTILIZZO DELLA TECNICA KRDM	26
2.9 GLI STIMOLI KRDM E GLI ESPERIMENTI SUGLI ANIMALI	28
2.9.1 KRDM NELLA SCIMMIA	29
2.9.2 KRDM NEI TOPI E NEI RATTI	32
2.9.3 KRDM NEI PICCIONI	33
2.9.4 KRDM NELLO ZEBRAFISH	34
3. IL MODELLO: DROSOPHILA MELANOGASTER	37
3.1 DROSOPHILA, MODELLO ANIMALE	37
3.1.1 L'ASPETTO DI DROSOPHILA	39
3.1.2 IL CICLO VITALE	39
3.2 DROSOPHILA, MODELLO GENETICO	41

3.2.1 IL GENOMA DI DROSOPHILA	42
3.2.2 L'UTILIZZO GENETICO DI DROSOPHILA.....	43
3.3 IL SISTEMA NERVOSO DI DROSOPHILA.....	44
3.3.1 IL COMPLESSO CENTRALE (CX).....	46
3.3.2 SVILUPPO DEL SNC.....	47
3.3.3 IL SISTEMA VISIVO IN DROSOPHILA.....	48
3.4 TOOLS GENETICI E OPTOGENETICI IN DROSOPHILA	50
3.4.1 TRANSGENESI	51
3.4.2 MANIPOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ NEURONALE.....	52
3.4.3 OPTOGENETICA	53
3.5 DROSOPHILA, MODELLO COMPORTAMENTALE.....	55
3.5.1 APPRENDIMENTO E MEMORIA	56
3.6 LE RISPOSTE OPTO-MOTORIE.....	57
3.6.1 ELABORAZIONE DEI SEGNALI VISIVI IN DROSOPHILA.....	59
3.6.2 STUDI DI TETHERING	60
4. SCOPO DELLA TESI	65
5. MATERIALI E METODI	66
5.1 MODELLO SPERIMENTALE	66
5.1.1 NUTRIZIONE	67
5.2 PREPARAZIONE DEI SOGGETTI SPERIMENTALI	68
5.3 SETUP SPERIMENTALE	71
5.4 STIMOLO VISIVO E REGISTRAZIONE DEL COMPORTAMENTO.....	74
5.5 ANALISI E ANALISI STATISTICHE	76
6. RISULTATI	78
6.1 SEZIONE 1.....	78
6.2 SEZIONE 2.....	81
7. CONCLUSIONI	84
8. BIBLIOGRAFIA	86
9. RINGRAZIAMENTI	90

1. RIASSUNTO

Nell'uomo, i movimenti oculari hanno due principali funzioni: stabilizzare lo sguardo, nel caso in cui l'osservatore sia in movimento relativo rispetto al campo visivo, e orientare lo sguardo, in modo che l'oggetto saliente venga focalizzato sulle aree della retina con la maggiore acuità visiva. L'attenzione visiva selettiva non è però possibile per due stimoli contemporaneamente, ma per uno solo.

Esistono due diverse tipologie di movimenti oculari per focalizzare sulla retina gli oggetti visivi salienti. I movimenti saccadici rappresentano la capacità degli occhi di muoversi (σακκαδάκια “salti”) per focalizzare rapidamente tra diversi oggetti salienti del campo visivo. In tal modo, oggetti poco focalizzati disposti alla periferia del campo visivo, vengono selettivamente selezionati e focalizzati sulla fovea. I processi che precedono la focalizzazione dell'oggetto sulla fovea e precedono, quindi, il movimento saccadico, sono di estrema importanza.

Essi, infatti, interessano i meccanismi attraverso cui agisce il processo attentivo in grado di selezionare (in anticipo, rispetto alla sua successiva focalizzazione) un oggetto, tra le migliaia presenti nel campo visivo. Molto probabilmente questi meccanismi richiedono la presenza di una mappa retinica ad un livello pre-attentivo, cioè ad un livello subconscio. I movimenti di inseguimento sono movimenti fluidi degli occhi che permettono di seguire un bersaglio visivo in movimento, mantenendone l'immagine sempre focalizzata sulla fovea. Tra i movimenti oculari per stabilizzare lo sguardo, il riflesso opto-cinetico permette di stabilizzare l'immagine sulla retina quando il campo visivo intero si muove (slittamento) rispetto alla retina.

La capacità di porre l'attenzione su un determinato oggetto in movimento è stata studiata nell'uomo ed in alcuni animali superiori, tramite lo stimolo tipo “*Random Dots Motion kinematogram (kRDM)*”, ovvero uno stimolo visivo caratterizzato da punti neri in movimento casuale su uno sfondo bianco.

Tramite un algoritmo, è possibile creare dei pattern di stimolazione in cui una percentuale di dots si muove coerentemente nella stessa direzione: con una coerenza del 100% tutti i dots si muovono nella stessa direzione; con coerenza 0% tutti i dots si muovono in direzione differente l'uno dall'altro. Per un individuo sarà più facile percepire la direzione del movimento alle coerenze maggiori, mentre sarà verosimilmente più complicato a coerenze minori.

Basandosi su di un processo percettivo di tipo cognitivo, è pertanto interessante studiare la risposta al kRDM di animali vicini o lontani dall'uomo dal punto di vista evolutivo. Infatti, in tal modo è possibile analizzare la comparsa e lo sviluppo nel corso dell'evoluzione di processi cognitivi semplici come la percezione del movimento e studiarne i circuiti in sistemi nervosi semplici o complessi.

Tale analisi, poi, è ancora più interessante se tali studi vengono condotti su animali invertebrati rispetto ai vertebrati, per la differente struttura anatomica del sistema nervoso centrale. Partendo da queste premesse, si è studiata la risposta visuo-motoria al kRDM di *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster, il moscerino della frutta, è un invertebrato in cui è possibile utilizzare tools genetici per analisi complesse di tipo comportamentale in cui specifici neuroni del sistema nervoso possono essere attivati/disattivati con moderne tecniche optogenetiche, permettendo l'analisi delle risposte comportamentali in condizioni in cui i circuiti nervosi che le sottendono sono influenzati dallo sperimentatore.

Le risposte attentive in *Drosophila* sono diverse rispetto all'uomo, in quanto il movimento saccadico comporta una riorganizzazione dell'intero corpo dell'animale, e non soltanto dell'apparato visivo, per poter individuare nella scena l'oggetto d'interesse.

Soggetti adulti e femmine di *Drosophila* della specie Berliner sono quindi state analizzate mediante una tecnica di tethering. Le *Drosophila* sono state immobilizzate ad uno spillo e successivamente attaccate all'interno di un'apparecchiatura, illuminate da dei led e rivolte verso un foglio sul quale, tramite l'utilizzo di un proiettore, sono stati proiettati i vari stimoli visivi tipo kRDM di varia coerenza.

A seconda dei vari stimoli percepiti, la *Drosophila* poteva esplicitare la capacità di orientare interamente il corpo, in una direzione o nell'altra, e sono state analizzate in particolar modo le risposte date dalla testa.

Dalla registrazione mediante una videocamera delle risposte di tipo visuo-motorie della *Drosophila* nei confronti dei random dots, sono stati elaborati dei dati mediante l'utilizzo di particolari sistemi di MATLAB, e questi verranno successivamente discussi all'interno della tesi.

2. INTRODUZIONE

2.1 IL SISTEMA NERVOSO

Il sistema nervoso è l'insieme degli organi e delle strutture che permettono di trasmettere segnali tra le diverse parti del corpo e di coordinare le sue azioni e le sue funzioni volontarie e involontarie, sia fisiche che psicologiche. Al suo interno è possibile distinguere un sistema nervoso centrale (SNC) e un sistema nervoso periferico (SNP), a loro volta suddivisibili in più componenti, ognuna dotata di una funzione specifica.¹

Il SNC è composto dall'encefalo e dal midollo spinale; è il centro di elaborazione e di integrazione delle informazioni che provengono dall'esterno dell'organismo con quelle che si generano all'interno, nonché la sede di tutte le funzioni nervose più complesse. Il SNP è composto da tutti gli elementi nervosi che non fanno parte del SNC; comprende i recettori sensoriali, i gangli periferici, i nervi cranici e i nervi spinali.

L'unità funzionale del sistema nervoso è il neurone, che rappresenta la più piccola struttura capace di eseguire tutte le funzioni del sistema. La loro struttura è composta da prolungamenti (processi) che si allontanano dal corpo cellulare (soma) e danno origine ai dendriti, che ricevono segnali in entrata, e all'assone, che conduce segnali di comando in uscita. I neuroni si possono classificare in base alla loro struttura o alla loro funzione. Dal punto di vista strutturale, si distinguono in:

- 1) Pseudounipolari, dove i dendriti e l'assone si fondono creando un unico processo;
- 2) Bipolari, possiedono un dendrite e un unico assone;
- 3) Multipolari, dove sono presenti vari dendriti e soltanto un assone;
- 4) Anassonici, formati solo da dendriti e senza un assone ben identificato.

Dal punto di vista funzionale, invece, possono essere suddivisi in:

- Neuroni afferenti (sensitivi), che trasportano l'informazione su luce, dolore, temperatura, pressione e altri stimoli, dai recettori sensitivi periferici verso il SNC;
- Interneuroni, sviluppati interamente nel SNC e con ramificazioni molto complesse;
- Neuroni efferenti (motorii somatici e autonomi), con un soma molto sviluppato, un ampio numero di dendriti e un assone che trasporta, verso gli organi effettori, i segnali elettrici generati dal SNC.

I circuiti nervosi più complessi, senza dubbio, sono quelli cerebrali, in cui un vasto numero di neuroni è connesso per dare origine a funzioni diverse e vitali, quali la pianificazione degli atti motori, la comprensione e la formazione delle parole, l'apprendimento e la formazione della memoria, la

percezione di ciò che ci circonda. La spiegazione con la quale le reti di neuroni possano generare queste funzioni costituisce uno dei più ambiziosi traguardi della scienza, ma nonostante la vastità di studi condotti, dal punto di vista clinico e sperimentale, si è tutt'ora lontani dalla completa conoscenza di questi processi. I progressi più significativi derivano, probabilmente, da due tipi di approcci diversi per quanto concerne lo studio delle funzioni cerebrali:

- 1) Approccio riduzionistico, basato sull'analisi strutturale e funzionale delle sinapsi, dei canali ionici e dei recettori che rendono possibili le comunicazioni intercellulari. Quest'approccio è basato sul presupposto che le funzioni cerebrali derivino dalle proprietà biologiche dei singoli neuroni e dalla loro organizzazione in circuiti di comunicazione. Partendo da tale presupposto, ci si è resi conto che le proprietà biologiche dei neuroni che si trovano in differenti regioni del sistema nervoso sono molto simili, e sono molto simili anche a quelle dei neuroni di specie animali differenti. Ciò che distingue, quindi, una regione cerebrale da un'altra, e il cervello di una specie animale da un'altra, è principalmente il numero dei neuroni e l'organizzazione delle loro interconnessioni.
- 2) Approccio integrato, basato principalmente sull'analisi dell'attività bioelettrica e metabolica neuronale durante lo svolgimento di diverse funzioni comportamentali (ad esempio, mentre si osservano delle immagini o si rievoca un ricordo). Tale approccio ha consentito di verificare che ogni funzione comportamentale dipende dall'attività di neuroni situati in specifiche regioni del sistema nervoso.²

2.2 LA CORTECCIA CEREBRALE

Il cervello è la ragione più vasta del SNC nell'uomo. È costituito da due emisferi cerebrali, ciascuno dei quali a sua volta è composto dalla corteccia cerebrale, dalla sostanza bianca e da tre formazioni nucleari profonde, ovvero i nuclei della base, l'amigdala e l'ippocampo. La corteccia cerebrale è la sede di svariate funzioni fondamentali per l'uomo, e può essere suddivisa in cinque lobi principali, ciascuno dei quali svolge prevalentemente delle funzioni specifiche:

- Lobo frontale: formazione delle parole, controllo della contrazione della muscolatura scheletrica, programmazione delle azioni;
- Lobo parietale: percezione somatosensoriale e gustativa;
- Lobo limbico: emozioni, motivazione;
- Lobo temporale: interpretazione generale ("intelligenza"), percezione uditiva e olfattiva, apprendimento e memoria di tipo dichiarativo;
- Lobo occipitale: percezione visiva.²

2.2.1 AREE CORTICALI ASSOCIATIVE

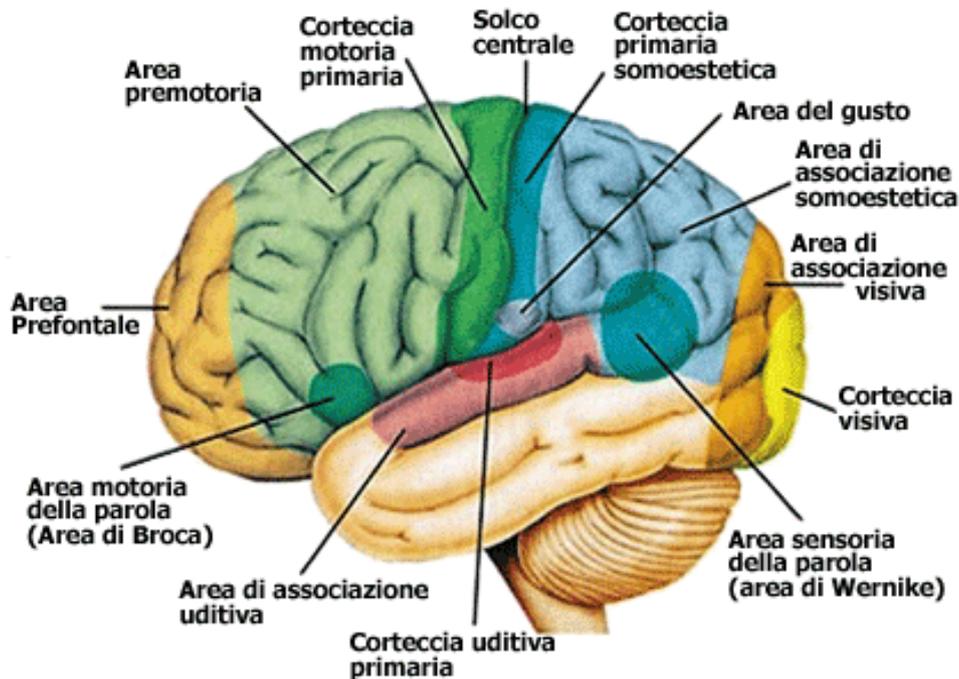


Figura 1. *Mapa delle aree funzionali della corteccia cerebrale*³

Le aree corticali implicate nelle funzioni motorie e sensoriali costituiscono solo una parte della corteccia, mentre la maggior parte è occupata da aree inizialmente che vennero definite “mute” dagli studi di stimolazione elettrica nel corso di interventi neurochirurgici: queste stimolazioni evocavano risposte motorie a bassa soglia di stimolazione da alcune aree (per questo motivo definite motorie) e percezioni sensoriali da altre (definite sensoriali), mentre alcune aree vennero inizialmente definite “mute” poiché non erano stati ottenuti particolari effetti durante la stimolazione. Studi successivi hanno reso possibile la caratterizzazione di queste aree (Figura 1), scoprendo che le connessioni con altre regioni cerebrali sono numerose e dirette anche a una grande varietà di strutture sottocorticali. Per questo motivo, tali aree corticali vennero definite “associative”, e studi di anatomia comparata hanno dimostrato che la dimensione di tali aree aumenta nella filogenesi: esse sono molto ridotte nei mammiferi inferiori mentre sono molto più estese a livello dei primati, quindi il passaggio evolutivo all’uomo si caratterizza per un aumento rilevante di dimensioni.²

2.2.2 LE FUNZIONI CEREBRALI SUPERIORI

Studi di psicofisiologia hanno permesso di comprendere in quali funzioni sono applicate queste aree associative, in particolar modo le tre aree associative principali: frontale, temporale e parietale. Tali funzioni comprendono gli aspetti cognitivi (mediante i quali un individuo riesce a comprendere, a conoscere e a guidare il funzionamento del proprio comportamento) e si manifestano principalmente nell’uomo, portando a differenziarlo dalle specie meno evolute; anche per tale motivo, queste funzioni

sono state definite funzioni “superiori” del sistema nervoso.² Le funzioni cerebrali superiori utilizzano l’informazione sensoriale elaborata dalle aree sensoriali per formulare concetti complessi che possono essere comunicati, ricordati, a breve o a lungo termine, usati per creare nuove idee, associazioni e scopi, e che possono essere sviluppati in una azione. Si tratta di funzioni complesse, quali apprendimento, memoria, linguaggio, capacità di ragionamento, di pianificazione, di risolvere un problema; anche la percezione e l’azione possono essere considerate funzioni superiori, in considerazione della complessità del compito di riconoscere uno stimolo o di mettere in atto il piano motorio adatto a ottenere uno scopo. Le funzioni cerebrali superiori emergono probabilmente dalla coordinazione delle attività delle diverse aree associative. Ad esempio, le associazioni fra la corteccia parietale e la corteccia prefrontale sembrerebbero le principali responsabili delle funzioni superiori più vicine a quella che definiamo intelligenza.⁴

Nonostante i dati anatomici abbiano contribuito alla conoscenza delle aree associative, rimane comunque complicato stabilire la localizzazione corticale di specifiche funzioni cerebrali: la più rilevante fonte di informazioni viene ricavata dall’osservazione di pazienti con lesioni specifiche di porzioni limitate delle aree corticali associative; tali studi hanno permesso una suddivisione funzionale grossolanamente indicativa, non essendo possibile delimitarne con precisione i limiti topografici, com’è invece possibile per le aree motorie e sensoriali primarie. Ad esempio, in pazienti con una lesione unilaterale del lobo parietale, si manifesta la sindrome di negligenza controlaterale: questi pazienti, pur presentando una normale sensibilità visiva e somatica, sono incapaci di percepire e prestare attenzione agli oggetti che si trovano nello spazio visivo opposto alla sede della lesione. L’area temporale, invece, svolge la funzione di identificare e riconoscere gli stimoli che attirano la nostra attenzione: la lesione di quest’area determina disturbi definiti come “agnosie” (dal greco agnosis, “non conoscere”), che possono comprendere sia difetti di memoria che di natura semantica. Una forma di agnosia molto conosciuta è la “prosopagnosia” (dal greco prosopon, “volto”), che consiste nell’incapacità di ricordare ed identificare i volti, persino di amici o parenti.²

2.3 L’APPRENDIMENTO

L’apprendimento è una funzione psicologica, connessa con la memoria, che provvede a produrre acquisizione, fissazione ed elaborazione di nuovi contenuti di esperienza e di nuovi modi di comportamento.⁵ Il processo di apprendimento implica l’acquisizione di una modalità di risposta nuova e stabilmente diversa su cui influiscono diversi aspetti:

- a) Strategie cognitive personali, stili di apprendimento, esperienze individuali e collettive;
- b) Fenomeni dell’ambiente circostante, informazioni e stimoli provenienti dalla realtà esterna;

c) Modelli, formalismi, teorie e dinamiche delle agenzie educative;

d) Mezzi di comunicazione e processi che regolano lo scambio delle informazioni.⁶

L'apprendimento è, quindi, il processo mediante il quale le conoscenze riescono a modellare il sistema nervoso e, di conseguenza, il comportamento. Tali conoscenze modellano il modo in cui l'essere umano percepisce, agisce, pensa e pianifica, tramite un'alterazione a livello dei circuiti neurali implicati. Esistono diverse tipologie di apprendimento, tra le quali vi sono:

- 1) Apprendimento percettivo, ovvero la capacità di imparare a riconoscere determinati stimoli che sono stati percepiti precedentemente. Consiste nella capacità di identificare oggetti, ambienti, situazioni, in modo tale da apprendere come comportarsi nei loro confronti. Si realizza mediante cambiamenti a livello della corteccia associativa sensoriale: il riconoscimento di stimoli visivi complessi, ad esempio, implica cambiamenti a livello della corteccia associativa visiva.
- 2) Apprendimento stimolo-risposta, che consiste nella capacità di imparare ad eseguire uno specifico comportamento in funzione di un determinato stimolo. Richiede il consolidamento di connessioni tra circuiti coinvolti nella percezione e nel movimento, e può consistere in una risposta automatica o in una sequenza di movimenti precedentemente appresi.
- 3) Apprendimento associativo, che implica la capacità di creare una relazione, quindi un'associazione, tra stimoli differenti, o tra uno stimolo ed un comportamento.⁷

2.4 LA MEMORIA

Il concetto di apprendimento, cioè il processo di acquisizione di nuove conoscenze, è strettamente correlato al concetto di memoria, che consiste nella loro codificazione, conservazione e utilizzazione. Sebbene sia ancora per certi versi arbitraria, si può attuare una classificazione di diversi tipi di memoria, in base a criteri qualitativi e temporali.

In base a criteri qualitativi, è possibile distinguere due tipi di memoria, che si formano in diverse regioni cerebrali: la memoria dichiarativa e la memoria procedurale.

- 1) La memoria dichiarativa (o esplicita) riguarda informazioni accessibili alla coscienza e che possono essere “dichiarate”, ovvero espresse verbalmente. A questo tipo di memoria, a loro volta, appartengono due tipi di memoria:
 - a) Memoria episodica, che fa riferimento ad esperienze personali, cioè a fatti accaduti in un particolare luogo e momento;

- b) Memoria semantica, che riguarda la conoscenza di concetti e nozioni non legati a riferimenti spazio-temporali.
- 2) La memoria procedurale (o implicita) riguarda capacità che vengono acquisite gradualmente, tramite la ripetizione di una certa esperienza. A questo tipo di memoria appartengono le procedure motorie, come ad esempio sapere come si va in bicicletta o come si suona uno strumento, e la memoria associativa di condizionamento difensivo, cioè il comportamento acquisito in risposta ad uno stimolo che causa dolore o incute paura.

In base a criteri temporali, cioè in base alla durata, è possibile distinguere vari tipi di memoria:

- 1) La memoria immediata (o sensoriale), che consente di ricordare per un secondo o poco più le informazioni che provengono da tutti gli organi di senso, consentendo la consapevolezza di ciò che accade intorno. Possono essere acquisite molte informazioni sensoriali contemporaneamente, ma solo una piccola parte verrà poi indirizzata verso forme di memoria più stabili, sia di tipo dichiarativo che procedurale.² La memoria sensoriale si avvale di un registro sensoriale (uno per ogni modalità sensoriale, da cui la distinzione in memoria ecoica, iconica, olfattiva, gustativa, tattile e propriocettiva) in grado di captare e di trattenere per il tempo necessario l'informazione proveniente dagli organi di senso.⁶
- 2) La memoria a breve termine, che consente di ricordare le informazioni per un periodo di tempo compreso tra un secondo e alcuni minuti. Nella formazione di questo tipo di memoria si attua un processo di codificazione, che consente di interpretare l'informazione e di mantenerne più a lungo il ricordo. Un particolare tipo di memoria a breve termine è la memoria di lavoro (o operativa), che consente di ricordare le informazioni il tempo necessario per poterle elaborare mediante attività cognitive quali il confronto con altre memorie, il ragionamento, la soluzione di problemi.
- 3) La memoria a medio termine e la memoria a lungo termine, che sono entrambe frutto del processo di consolidamento di memorie a breve termine. Nella prima, il consolidamento si basa su un potenziamento transitorio della trasmissione sinaptica indotto dall'attivazione di secondi messaggeri e dalla fosforilazione di proteine, che consente di mantenere il ricordo per non più di due ore, mentre nella seconda il potenziamento si mantiene più a lungo perché comporta anche la sintesi di nuove proteine, che permettono modificazioni funzionali e strutturali delle sinapsi anche molto durature nel tempo, per poter mantenere i ricordi per ore, giorni, anni o addirittura per tutta la vita.

Un tipo di memoria particolare, che non dipende dall'apprendimento, è la memoria filogenetica. Questa è costituita dalle informazioni acquisite dall'esperienza dei nostri avi nel corso

dell'evoluzione, informazioni che rimangono fissate nel codice genetico e guidano i comportamenti innati: la capacità del neonato di assumere il latte materno, il senso di repulsione per l'odore e il sapore di cibi avariati. Questa non è ancora del tutto stata approfondita.²

2.4.1 LA MEMORIA ICONICA

Ad ogni sistema sensoriale (vista, olfatto, udito, gusto, tatto) è associato un tipo di memoria. Per quanto riguarda la vista, ad essa viene associata la memoria visiva, all'interno della quale può essere ritrovata la memoria iconica, ovvero una forma di memoria che si basa sulla memorizzazione di impressioni e sensazioni visive a breve termine. La memoria iconica è una componente della memoria sensoriale che coinvolge un archivio di informazioni visive in rapido decadimento⁸, e fornisce una rappresentazione coerente ma fugace della nostra percezione visiva. Viene definita iconica a causa delle icone/immagini che elabora il cervello nei confronti di ciò che viene osservato, utilizzando tali icone per completare le percezioni di brevissima durata e per trarre conclusioni dagli stimoli visivi percepiti. Uno dei primi studiosi a fare ricerche sulla memoria iconica fu George Sperling⁸. Nel corso di alcune ricerche, egli trovò che quando proiettava su uno schermo, per non più di 1/20 di secondo, diapositive in cui comparivano 9 lettere, i soggetti erano in grado di leggerle tutte, ma riuscivano a nominarne solo 4-5. Sperling, quindi, ipotizzò che essi non riuscissero a ricordarle, non perché non l'avessero viste, ma perché non le avevano conservate abbastanza a lungo per poterle memorizzare. Ciò confermò l'idea che la memoria iconica fosse un sistema a rapido decadimento e che l'informazione venisse codificata in una forma simile allo stimolo originale (e che altri stimoli visivi, dunque, potevano produrre interferenza ed ostacolare il processo di codifica). Successivamente il ricercatore chiese a dei soggetti non di ricordare tutte le lettere, ma di ricordare solo quelle accompagnate da un suono: in questo caso accadeva raramente che i soggetti tralasciassero una lettera. Questa era una evidente prova del fatto che noi possediamo una memoria iconica o fotografica, ma che questa ha una capacità solo di qualche decimo di secondo, perciò se si vuole che una persona ricordi un'informazione bisogna darle il tempo di trasmetterla nel deposito a breve termine. Ciò, per fortuna, non costituisce un problema, in quanto nella visione normale la maggior parte delle fissazioni dura abbastanza a lungo affinché l'informazione a disposizione possa essere elaborata. Di solito non si è consapevoli della memoria iconica: mentre i nostri occhi si spostano da un punto all'altro della scena che stiamo osservando, l'immagine prodotta da ogni nuovo punto fissato annulla quella precedente, per questo le due immagini non si sovrappongono mai nella mente. Tuttavia, man mano che il nostro sguardo si sposta nella memoria sensoriale, resta comunque traccia di quell'informazione. Ciò ci consente di avere una visione integrata del mondo, non scomposta in una successione di immagini separate.⁹

2.5 SENSAZIONE E PERCEZIONE

In ogni momento l'individuo è immerso in un ambiente fisico, dal quale arrivano in continuazione, ai suoi organi di senso, un'elevata varietà e moltitudine di stimoli, ovvero manifestazioni delle diverse forme di energia (come le radiazioni luminose o le onde sonore). La sensazione può essere definita come l'esperienza soggettiva associata a uno stimolo fisico, ed implica la registrazione e la codificazione dell'informazione contenuta nello stimolo da parte degli organi di senso e delle vie neurali. Questa informazione, codificata in messaggi nervosi, viene inviata al cervello che la decodifica e la analizza sino ad estrarne un'interpretazione significativa: questo processo di organizzazione dei dati sensoriali in un'esperienza può essere considerato il fine ultimo della sensazione e prende il nome di percezione, ovvero il processo che implica l'interpretazione e l'attribuzione di senso alle sensazioni. L'uomo è in grado di rispondere soltanto a determinate forme fisiche di stimolazione, ovvero quelle per le quali ha a disposizione particolari apparati recettivi (o organi di senso) in grado di captarle e di riceverle. Ad esempio, il sistema visivo è in grado di rispondere a determinate bande dell'energia elettromagnetica (la luce).⁶

La psicofisica è l'analisi della relazione tra le caratteristiche fisiche degli stimoli e le percezioni.² Per spiegare il processo della percezione viene definita la cosiddetta "catena psicofisica" (mostrata come esempio nella Figura 2), ovvero una sequenza di passaggi che consta di:

- Stimolo distale (o fisico), rappresentato dalla materia/forma di energia che colpisce gli organi di senso (esempio: luce);
- Stimolo prossimale (o risposta fisiologica), ovvero il complesso delle attività chimico-elettriche innescate dallo stimolo che avvengono a livello degli organi di senso, dei nervi e del cervello;
- Percetto (o esperienza sensoriale), cioè la sensazione vera e propria, un'esperienza psicologica soggettiva e individuale (esempio: visione, suono, sapore, ecc.).¹⁰



Figura 2. Rappresentazione della catena psicofisica¹¹

I percetti costituiscono il prodotto di due processi: la codificazione dell'informazione proveniente dall'esterno e l'organizzazione interna nell'organismo. Questi, infatti, riescono a fornire informazioni riguardanti lo stimolo fisico, che però sono informazioni diverse rispetto allo stimolo fisico in sé: ad esempio, se si è raggiunti da energia elettromagnetica con una lunghezza d'onda di 620 nm, si ha l'esperienza del colore rosso, che non è una proprietà intrinseca dell'energia elettromagnetica quanto piuttosto l'esperienza sensoriale/percettiva che se ne ricava.

Sia lo stimolo fisico che la risposta fisiologica sono eventi misurabili con mezzi fisici diretti, mediante strumenti quali, ad esempio, fotometri o sonometri, ed elettrodi collegati ad apparecchi per la registrazione dei segnali. L'esperienza sensoriale, invece, non è misurabile direttamente, ma solo in maniera indiretta attraverso l'osservazione del comportamento.¹²

2.6 L'APPARATO VISIVO

Tra i vari stimoli ai quali sono sottoposti quotidianamente gli uomini, rivestono sicuramente un'importanza particolare gli stimoli di tipo visivo, che vengono riconosciuti ed immagazzinati mediante l'utilizzo di un apparato visivo. L'occhio, o bulbo oculare, è l'organo di senso esterno dell'apparato visivo, che ha il compito di ricavare informazioni sull'ambiente circostante attraverso l'utilizzo di stimoli visivi (luce). L'occhio umano raccoglie gli stimoli provenienti dall'ambiente, ne regola l'intensità attraverso un diaframma (l'iride), li focalizza attraverso un sistema regolabile di lenti per formarne un'immagine sulla retina e, in fine, trasforma questa immagine in una serie di segnali elettrici che attraverso il nervo ottico vengono inviati al cervello per l'elaborazione e l'interpretazione.¹³

Gli occhi sono come delle finestre sul mondo esterno, ma le loro intuizioni e funzionalità sono molto più ampie di quelle di qualsiasi finestra di vetro: sono in grado di catturare, regolare e trasformare la luce in un codice chimico che solo il cervello può decifrare. Gli "occhi" più semplici in natura sono noti come punti oculari, e sono presenti in alcuni organismi unicellulari e in molti metazoi che usano proteine e pigmenti fotorecettori per rilevare la luce dall'ambiente circostante e rispondere regolando i loro ritmi circadiani interni al ciclo quotidiano luce-buio. I sistemi ottici più complessi, che si trovano nel 96% delle specie animali, tuttavia, sono in grado di sfruttare la luce proveniente dall'ambiente, regolarne l'intensità attraverso un diaframma e focalizzarla usando una lente regolabile.¹⁴

Gli occhi dei vertebrati sono approssimativamente sferici. Quando la luce incontra l'occhio, viene rallentata, piegata, assorbita e convertita in impulsi elettrochimici per essere elaborata dal cervello. Quando la luce si avvicina all'occhio, entra in contatto con la cornea: la cornea rifrange la luce e le

permette di convergere all'interno dell'occhio nel suo percorso verso l'iride e la pupilla. A seconda dell'intensità e della disponibilità di luce, l'iride si contrarrà o si espanderà per regolare le dimensioni della pupilla, regolando così la quantità di luce che può entrare nell'occhio. In ambienti con scarsa illuminazione, la pupilla sarà più grande, in modo che la poca luce presente possa passare e formare un'immagine distinguibile. Accade il contrario, invece, quando la luce è abbondante. Una volta attraversata la pupilla, la luce viene ricevuta dal cristallino, che è in grado di cambiare la sua forma con l'aiuto di muscoli ausiliari e di portare oggetti a varie distanze a fuoco attraverso il processo di accomodazione. Il cristallino, inoltre, migliora leggermente l'immagine già riprodotta dalla cornea e la proietta sulla retina. La retina, che letteralmente significa "rete", attira la luce attraverso il suo fotorecettore e le epiteliali pigmentate: le molecole di fotopigmento di questi fotorecettori assorbono la luce, portando ad un cambiamento nei segnali elettrici (Figura 3). Questa conversione dell'energia luminosa in impulsi elettrici avvia una serie di segnali che viaggiano attraverso i neuroni della retina e nel nervo ottico, portando al cervello. Questi segnali vengono poi ricevuti ed elaborati dal cervello come immagini percepite.¹⁴

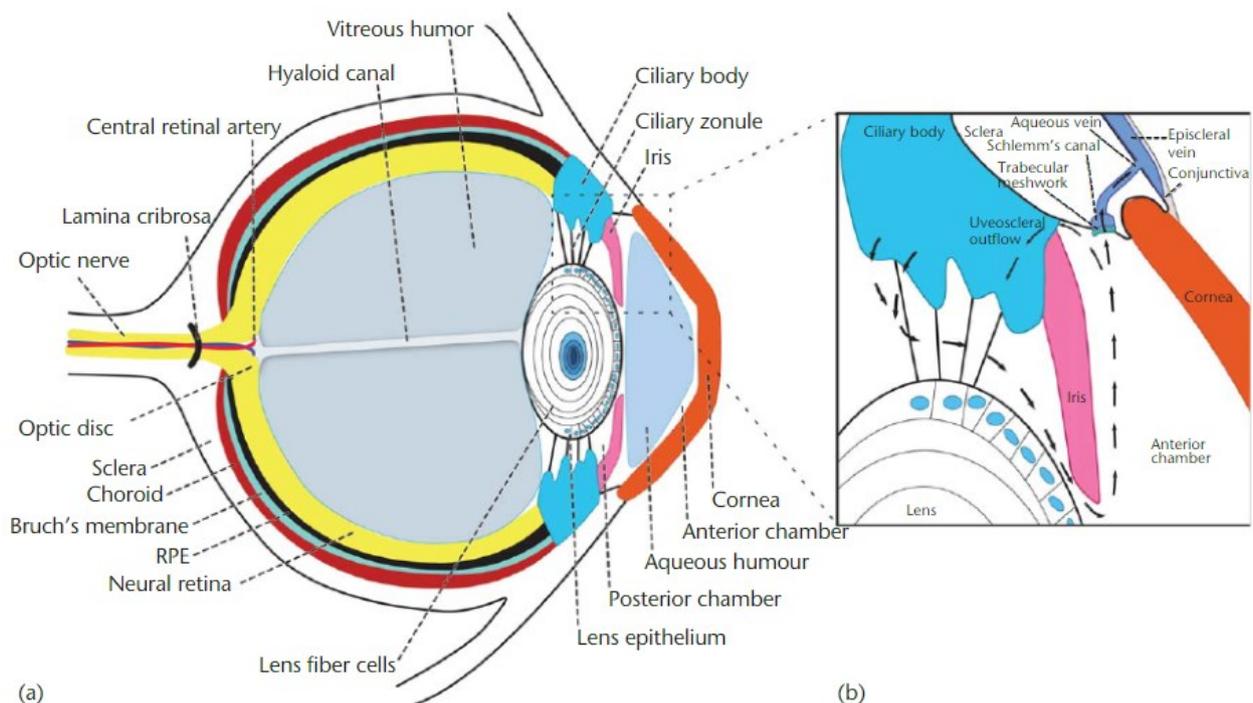


Figura 3. Schema di un occhio vertebrato. a) Le strutture di base dell'occhio dei vertebrati sono state codificate per colore. b) Ingrandimento della parte anteriore dell'occhio, raffigurante le strutture coinvolte nella circolazione dell'umore acqueo.¹⁵

L'apparato visivo degli esseri umani e di altri primati è una storia di successo evolutivo. Questo, infatti, ha sviluppato un elaborato sistema di sensori periferici, la retina, in cui le informazioni raccolte da oltre 100 milioni di recettori vengono compresse in modo altamente efficiente e inviate al sistema nervoso centrale da 1,5 milioni di assoni che lasciano gli occhi. La complessità e il livello di

sofisticazione della retina sono abbinati a una gerarchia di elaborazione corticale dedicata che comprende più di 30 aree anatomicamente e/o funzionalmente distinte che coprono circa il 50% della corteccia cerebrale nei macachi e il 20-30% negli esseri umani. Sebbene tale sistema raccolga una grande vastità di informazioni, la corteccia visiva altamente sviluppata dei primati non sarebbe sufficiente per elaborarle tutte in modo ottimale e uniforme. Per questo motivo, esistono due sistemi interagenti che si sono evoluti per contrastare questa limitazione: un sistema bottom-up, che comprime sostanzialmente le informazioni raccolte dai fotorecettori retinici, e un sistema top-down, che colloca dinamicamente le risorse di elaborazione centrali per le informazioni visive ritenute più rilevanti nella situazione attuale. Quest'ultimo sistema è il sistema deputato all'attenzione selettiva.¹⁶

2.6.1 L'ATTENZIONE VISIVA

Lo scopo della visione è quello di ottenere informazioni sull'ambiente circostante in modo da poter pianificare azioni appropriate. Si consideri, ad esempio, una passeggiata in spiaggia rispetto a un'escursione in montagna: entrambe le attività coinvolgono la locomozione, ma ognuna pone esigenze molto diverse sui sistemi percettivi e di azione, compreso il sistema visivo. Nel caso della passeggiata, la spiaggia è ampia, ci sono pochi ostacoli e pochi rischi, mentre nel caso dell'escursione, invece, il sentiero è stretto; rocce, vegetazione e precipizi scoscesi devono essere evitati. Per rimanere al sicuro, occorre considerare quali sono i rischi, e questo implica invariabilmente sapere quali oggetti sono presenti nella scena visiva.¹⁷

L'attenzione visiva può essere definita come un insieme di risorse di elaborazione o di meccanismi cognitivi in grado di modulare i segnali a quasi tutti i livelli del sistema visivo. Il termine "attenzione visiva" descrive un insieme di meccanismi che modellano ciò che vediamo e ciò su cui possiamo agire, consentendo la selezione simultanea di alcune informazioni (preferibilmente rilevanti) e l'inibizione di altre informazioni: questa selezione consente di ridurre la complessità e il sovraccarico di informazioni, sottoforma di stimolo visivo, che giungono all'occhio umano. Gli effetti attentivi possono assumere la forma di modulazione o miglioramento delle informazioni selezionate, ed un ruolo centrale per l'attenzione selettiva è quello di consentire il "legame" di informazioni selezionate in rappresentazioni unificate e coerenti di oggetti nel mondo esterno.¹⁸

Ci sono tre caratteristiche dell'attenzione visiva che sono state stabilite tramite degli studi psicofisici:

- 1) L'attenzione visiva seleziona le informazioni rilevanti, cioè, alcuni segnali sensoriali ricevono un trattamento preferenziale;

- 2) L'elaborazione delle informazioni selezionate e non selezionate è modulata in modo differenziale, ovvero l'attenzione cambia il modo in cui le informazioni sensoriali vengono elaborate;
- 3) La modulazione selettiva ha conseguenze percettive, ovvero, cambia il peso o la rilevanza di diversi aspetti dell'ambiente visivo in funzione della loro rilevanza comportamentale, creando una rappresentazione che valorizza alcuni aspetti a scapito di altri.¹⁶

2.6.2 FUNZIONI DELL'ATTENZIONE VISIVA

L'attenzione visiva è fondamentale per almeno quattro diversi scopi a livello del sistema visivo, tra cui la riduzione dei dati, il miglioramento dello stimolo, l'integrazione delle caratteristiche dello stimolo e in fine il suo riconoscimento.

1) Riduzione dei dati/selezione degli stimoli

I sistemi che controllano la cognizione e l'azione della percezione a livello visivo mostrano dei limiti, in quanto il cervello non è in grado di elaborare simultaneamente il continuo afflusso di informazioni proveniente dall'ambiente. Uno dei ruoli più critici per l'attenzione visiva è quello di filtrare le informazioni visive: è stato dimostrato che l'attenzione visiva può svolgere questa funzione sopprimendo attivamente stimoli irrilevanti o selezionando stimoli potenzialmente rilevanti. In entrambi i casi, l'attenzione consente di utilizzare risorse limitate per l'elaborazione di alcuni stimoli piuttosto che di altri.^{19,18}

2) Miglioramento dello stimolo

Gli input al sistema visivo sono rumorosi e ambigui, e l'attenzione visiva può agire per migliorare il segnale o l'ampiezza dell'attività neuronale nelle vie sensoriali nelle fasi iniziali dell'elaborazione visiva. Può, inoltre, migliorare o alterare l'elaborazione dello stimolo assistito, consentendo la risoluzione dell'ambiguità e la riduzione del rumore. Il miglioramento dello stimolo può essere una conseguenza dell'assegnazione diretta dell'attenzione a uno stimolo (ad esempio, lo spazio e l'attenzione basata sugli oggetti) o della direzione dell'attenzione su qualche attributo dello stimolo (ad esempio, il colore, "attenzione basata sulle caratteristiche"). Ciò consente all'osservatore di essere un ricercatore attivo e un elaboratore di informazioni. Dal punto di vista comportamentale, il miglioramento dello stimolo è osservabile in tempi di reazione più rapidi e maggiore precisione, mentre, dal punto di vista fisiologico, si osserva una maggiore attività delle popolazioni neuronali che elaborano lo stimolo.¹⁸

3) Integrazione di informazioni

Le prime fasi dell'elaborazione visiva sembrano coinvolgere la decomposizione del segnale in dimensioni separabili come il colore e l'orientamento, con queste dimensioni che vengono elaborate in una certa misura in diverse aree neurali.²⁰ Essendoci tale decomposizione funzionale, è stata sollevata la questione di come vengono integrate queste informazioni compartimentate per ottenere la percezione di un mondo unificato. Questo problema, o insieme di problemi, è indicato come il "problema vincolante": il ruolo dell'attenzione visiva nella risoluzione del problema può essere descritto in almeno due modi: (1) l'attenzione può consentire la generazione di rappresentazioni dello stimolo (ad esempio, congiunzioni arbitrarie di caratteristiche) che non sono "cablate" nel sistema visivo e (2) l'attenzione può risolvere le ambiguità che sorgono quando più stimoli cadono in un singolo campo ricettivo, forse alterando dinamicamente la selettività o l'estensione spaziale del campo ricettivo di un neurone.¹⁸

4) Riconoscimento dello stimolo

Riveste molta importanza il ruolo dell'attenzione nel riconoscimento degli stimoli percepiti. Il riconoscimento visivo viene definito come la capacità di identificare lo stimolo percepito, e non soltanto semplicemente di essere consapevoli della presenza di uno stimolo. Poiché i meccanismi di riconoscimento degli oggetti non possono gestire simultaneamente ogni oggetto sul campo, l'attenzione serve a fornire sottoinsiemi digeribili dell'input per il riconoscimento.²¹ Le funzioni sopra descritte riguardano prevalentemente l'elaborazione visiva spaziale, ma l'attenzione svolge ruoli simili nell'elaborazione temporale (ad esempio, evitando confusioni tra stimoli che appaiono in rapida successione) e nella gestione di diversi compiti visivi (ad esempio, consentendo al sistema di passare dalla ricerca di un bersaglio in un momento e forse al tracciamento di più oggetti nel momento successivo).¹⁸

2.6.3 L'ATTENZIONE VISIVA SPAZIALE

Ogni volta che apriamo gli occhi ci troviamo di fronte a una quantità importante di informazioni, eppure apparentemente comprendiamo il nostro mondo visivo senza sforzo. Per dare un senso a una scena, dobbiamo rilevare, localizzare e identificare le informazioni rilevanti. A causa dell'elevato costo energetico dell'attività neuronale, solo una frazione molto piccola di neuroni corticali può essere attiva (al di sopra del livello base) in un dato momento, e non possiamo elaborare tutte queste informazioni allo stesso modo. Concentrandoci su una determinata posizione o aspetto della scena visiva, l'attenzione ci consente di elaborare selettivamente le informazioni, dando priorità ad alcuni aspetti delle informazioni ignorandone altri.

L'attenzione visiva spaziale ci permette di elaborare selettivamente le informazioni in una determinata posizione²², e può essere definita come la capacità di una persona di prestare attenzione e di elaborare gli stimoli nello spazio circostante. Nell'attenzione visiva spaziale si possono distinguere diversi fattori: un fattore di tipo egocentrico e un altro di tipo allocentrico. La rappresentazione visiva spaziale egocentrica è importante per la pianificazione del movimento e il controllo motorio durante l'interazione diretta tra corpo e oggetti, mentre la rappresentazione allocentrica è importante per determinare i riferimenti spaziali nell'ambiente: l'interazione tra le due attenzioni visive spaziali allocentriche ed egocentriche permette di consentire l'elaborazione spaziale.²³

L'attenzione può essere assegnata spostando gli occhi verso un luogo (in inglese definita “overt attention”, chiara, palese) o nei confronti di un'area della periferia senza effettivamente dirigere lo sguardo verso di essa (definita “covert attention”, nascosta, segreta). L'impiego di quest'ultima ci aiuta a monitorare l'ambiente e può guidare i movimenti oculari verso luoghi del campo visivo in cui è probabile che si trovino informazioni salienti e/o rilevanti. Impieghiamo l'attenzione nascosta in molte situazioni quotidiane, come la ricerca di oggetti, l'attraversamento della strada, lo sport. Inoltre, quest'attenzione gioca un ruolo importante nelle situazioni sociali, in quanto muovere gli occhi fornisce uno spunto alle intenzioni che desideriamo nascondere. L'attenzione nascosta migliora vari aspetti di base dell'elaborazione visiva, come la sensibilità al contrasto, la risoluzione spaziale e la velocità di accumulo delle informazioni.

C'è un rapporto di interazione tra i due tipi di attenzione: a volte, assistiamo segretamente un luogo senza programmare un movimento oculare, mentre altre volte spostiamo prima l'attenzione spaziale nascosta e poi facciamo un movimento oculare per ispezionare ulteriormente l'oggetto che ha catturato il nostro interesse. L'opinione corrente è che un movimento oculare saccadico spesso, ma non necessariamente, segue uno spostamento nascosto dell'attenzione, ma che la pianificazione di un movimento oculare saccadico è preceduta da uno spostamento dell'attenzione, un fenomeno chiamato “attenzione presaccadica”.

L'attenzione selettiva nasce dalla limitata capacità del cervello di elaborare le informazioni. Il nostro cervello utilizza codici rappresentativi efficienti che si basano su una raccolta sparsa di neuroni attivi e collocano in modo flessibile le risorse metaboliche in base alle esigenze del compito. Le limitazioni energetiche consentono solo a una piccola frazione del meccanismo cerebrale di essere impegnata contemporaneamente e forniscono una base neurofisiologica per l'attenzione selettiva.²²

2.7 I MOVIMENTI OCULARI

Per movimento oculare si intende qualsiasi spostamento della posizione dell'occhio nella sua orbita. I movimenti oculari determinano quali informazioni raggiungono la nostra retina, la corteccia visiva e, soprattutto, i centri corticali più alti, quindi sono di fondamentale importanza per la visione, l'attenzione e la memoria, determinando ciò che vediamo, ciò di cui ci occupiamo e per ricordare ciò che ci circonda. Lavori scientifici suggeriscono che i circuiti cerebrali interessati in alcune funzioni esecutive, come l'attenzione spaziale e la memoria di lavoro spaziale, si sovrappongono a parti dei circuiti cerebrali funzionali al controllo dei movimenti oculari, pertanto si è arrivati alla conclusione della presenza di una stretta correlazione tra questi ultimi e le funzioni sopra descritte.²⁴

I movimenti oculari hanno principalmente due funzioni: far saltare gli occhi da un punto di fissazione a un nuovo punto di fissazione e stabilizzare l'immagine retinica tra i salti che avvengono. I salti sono chiamati movimenti oculari “saccadici”, ovvero degli sprint oculomotori che portano gli occhi in una nuova posizione il più rapidamente possibile, con la visione che viene inibita durante questo movimento: pertanto, tutto il normale processo di visione avviene durante la fissazione costante. I periodi di fissazione costante sono necessari perché la retina elabora le informazioni visive in un modo relativamente lento, e nel caso in cui un'immagine visiva si muovesse troppo velocemente attraverso la retina le informazioni si “spalmerebbero” rendendosi poco chiare.

Durante la fissazione, gli occhi sono raramente a riposo, perché compensano continuamente i movimenti della testa o i movimenti degli oggetti nel mondo visivo o entrambi. Una famiglia di riflessi mantiene la regione retinica di visione più nitida, la fovea, stabile rispetto all'immagine visiva. La fovea è una minuscola regione, di circa 1° di dimensione d'arco, che conferisce agli occhi la loro migliore acuità e la loro migliore discriminazione dei colori. Al di fuori di questa regione, l'acuità e la discriminazione dei colori diminuiscono rapidamente.²⁵

La fovea ha un ruolo unico nella percezione del movimento, nonché nell'acutezza e nella discriminazione dei colori percepiti. È essenziale stabilizzare l'immagine sulla fovea perché i recettori sono così strettamente imballati che anche un lento scivolamento dell'immagine fa sì che i contorni di un'immagine si muovano attraverso la retina ad una velocità di molti recettori al secondo. Allo stesso tempo, la stabilizzazione non dovrebbe essere perfetta, perché i recettori visivi che ricevono una stimolazione costante si adattano entro pochi secondi e cessano di rispondere. Quindi l'immagine non dovrebbe muoversi troppo velocemente o troppo lentamente attraverso la retina. Di solito il problema è quello di evitare che l'immagine si mosse troppo velocemente. Un certo numero di meccanismi fisiologici cooperano per stabilizzare la fovea e rendere ottima la visione.²⁵

2.7.1 TIPI DI MOVIMENTI OCULARI

A livello dell'essere umano esistono vari tipi di movimenti oculari, ognuno dei quali riveste un'importanza significativa e che opera spesso in cooperazione con altri movimenti oculari. Tra i più importanti ci sono:

1) Pursuit/Inseguimento

Un meccanismo specializzato per stabilizzare l'immagine sulla fovea è l'inseguimento visivo. Non appena un bersaglio visivo inizia ad allontanarsi dalla fovea, un movimento involontario (che non può essere volontariamente prevenuto) viene generato per spostare gli occhi in una direzione che riduce il drift (la "deriva"). Il ritardo nell'avvio di questo movimento di inseguimento compensativo è di circa 0,1s, una parte dei quali è dovuta al tempo per trasdurre il segnale visivo dalla luce all'attività neurale nella retina, mentre per circa altri 0,1s il sistema di inseguimento calcola la direzione ma non la velocità del drift, generando un movimento nella direzione del bersaglio con una velocità costante. Il sistema di inseguimento ha un limite di velocità, perché può tracciare con precisione i movimenti dell'immagine solo fino a circa 30° al secondo rispetto alla testa; al di sopra di questa velocità il sistema di inseguimento continua a generare movimenti compensatori, senza però riuscire a tenere il passo con lo stimolo. Nell'ambiente circostante, gli obiettivi visivi raramente si muovono con velocità e direzione costanti. Quando un bersaglio cambia il suo movimento, il sistema di inseguimento compensa questo con un controllo di feedback a circuito chiuso, ma sempre con un ritardo. Se il movimento è ripetuto e prevedibile, tuttavia, il sistema visivo crea un modello interno del movimento e alimenta la sua previsione al sistema di inseguimento. Di conseguenza, il tracciamento di un bersaglio prevedibile può avvenire più facilmente, e la previsione prende il sopravvento rapidamente: supponendo un monitoraggio di un'oscillazione sinusoidale, si ha inizialmente un ritardo di fase, ma nel giro di pochi cicli il ritardo scompare quando subentra il fenomeno di previsione.²⁵

2) Vergenza

I movimenti di vergenza allineano la fovea di ciascun occhio con bersagli situati a distanze diverse dall'osservatore. A differenza di altri tipi di movimenti oculari in cui i due occhi si muovono nella stessa direzione (movimenti oculari coniugati), i movimenti di vergenza sono non-coniugati (o disgiuntivi), e implicano una convergenza o una divergenza delle linee di vista di ciascun occhio per vedere un oggetto più vicino o più lontano.²⁶ I movimenti sono normalmente accompagnati da un accomodamento della lente e, poiché tale fenomeno comporta il cambiamento della forma di una lente altamente viscosa, il processo deve avvenire lentamente. Per mantenere una visione chiara, quindi, i movimenti di vergenza non devono essere più veloci dell'accomodamento. I movimenti di

vergenza e inseguimento possono avvenire contemporaneamente mentre si traccia un bersaglio in tre dimensioni. L'effetto dei movimenti di vergenza sulla percezione può essere isolato proiettando le immagini corrispondenti nei due occhi da fonti separate e spostando le sorgenti separatamente. Mentre gli occhi convergono e divergono per tracciare queste immagini, la dimensione percepita del bersaglio cambia di conseguenza.²⁵

3) Sistema vestibolare e sistema optocinetico

I movimenti oculari vestibolari sono suscitati da movimenti della testa che attivano i canali semicircolari. Il riflesso vestibolo-oculare (VOR) porta a movimenti oculari nella direzione opposta al movimento della testa, stabilizzando così le immagini sulla retina. L'interazione tra VOR e visione può essere testata fissandosi sul pollice con il braccio teso mentre ruota la testa: poiché il VOR compensa il movimento della testa, si nota che il pollice rimane a fuoco ma le immagini periferiche sono sfocate. Se il VOR è compromesso, qualsiasi movimento della testa provoca visione offuscata, proprio come scuotere una fotocamera sfoca le foto. Poiché i canali semicircolari sono più sensibili ai movimenti brevi o rapidi, il VOR funziona meglio anche negli stessi movimenti. I movimenti oculari optocinetici, invece, sono suscitati quando l'intero campo visivo è in movimento, ad esempio quando si guarda fuori dal finestrino di un'auto in movimento. Il riflesso optocinetico include un movimento oculare costante nella direzione in cui si muove la scena che serve a stabilizzare l'immagine sulla retina. Il nistagmo optocinetico è definito da un lento movimento oculare nella direzione di un oggetto in movimento e da un rapido ritorno della posizione dell'occhio nella direzione opposta. Il sistema vestibolare funziona con il sistema optocinetico per mantenere la messa a fuoco dell'immagine sulla retina durante i movimenti della testa. Il riflesso optocinetico è in grado di compensare i movimenti della testa sostenuti o lenti che sono scarsamente rilevati dall'apparato vestibolare.²⁷

4) Saccadi

Con il termine saccade si considera un movimento rapido e simultaneo di entrambi gli occhi, ovvero un salto, tra due o più fasi di fissazione nella stessa direzione che può essere associato ad uno spostamento di frequenza di un segnale emesso o a un movimento di una parte del corpo o di un dispositivo.²⁸ Gli esseri umani creano incessantemente saccadi per massimizzare il recupero di informazioni visive di alta qualità mediante la visione foveale. Sebbene il movimento saccadico sia balistico e stereotipato, le saccadi sono volontarie per quanto riguarda la scelta del dover fare o meno un movimento saccadico (quando guardare) e quale vettore saccadico programmare (dove guardare). Ad esempio, la lettura si realizza con una successione di saccadi volontarie, e durante ogni fissazione

(cioè tra le saccadi) il lettore elabora le parole mentre contemporaneamente programma la saccade successiva.²⁹

Il sistema saccadico è binoculare: entrambi gli occhi si muovono contemporaneamente nella stessa misura. Durante questi salti, gli occhi si muovono così rapidamente che non è possibile raccogliere informazioni visive utili: il movimento dell'immagine di taglio è così rapido che i recettori non possono trasdurre un segnale prima che le parti successive dell'immagine interferiscano. Se si inizia una saccade e poi si cambia idea, il movimento deve essere completato comunque, e una seconda saccade deve essere pianificata per raggiungere il nuovo obiettivo. Durante il processo di pianificazione della saccade, l'essere umano si impegna a creare una saccade prima che gli occhi inizino a muoversi. Poiché le saccadi sono preprogrammate, spesso non raggiungono esattamente i loro obiettivi. Quando sia gli occhi che la testa sono liberi di muoversi, la maggior parte delle saccadi più grandi sono accompagnate da un movimento della testa nella stessa direzione. Poiché la testa ruota molto più lentamente degli occhi, c'è una rapida saccade che porta gli occhi al bersaglio proprio mentre inizia il movimento della testa. Quindi, per mantenere gli occhi fissi sul bersaglio, inizia una deriva oculare compensatoria nella direzione opposta a quella del movimento della testa. Di conseguenza la posizione dello sguardo rispetto al bersaglio rimane stabile mentre gli occhi e la testa ruotano in direzioni opposte a velocità uguali. Alla conclusione del processo, gli occhi sono di nuovo centrati vicino alla loro posizione originale nell'orbita, ma la testa viene deviata da un lato.²⁵

Quando una persona sposta l'attenzione da una posizione all'altra, la prima cosa che di solito accade è che un movimento oculare saccadico sposta gli occhi nella nuova posizione. Le persone raramente guardano in un posto mentre elaborano le informazioni in un altro. L'occhio normalmente genera circa tre o quattro saccadi al secondo. Anche quando gli occhi non stanno esplorando attivamente, possono avvenire delle "microsaccadi", ovvero piccoli movimenti saccadici che si verificano durante quella che sembra all'osservatore una fissazione continua. Questo rende le saccadi, non accompagnate da altri comportamenti, di gran lunga il più frequente di tutti i comportamenti umani. Come tali sono di interesse centrale per gli psicologi che studiano il comportamento. Durante la vita, una persona genera più saccadi che battiti cardiaci. Lo spostamento dell'attenzione e l'esecuzione motoria della saccade non sono simultanei: l'attenzione guida l'azione fisica. Due bersagli possono essere brevemente lampeggiati a sinistra e a destra della fissazione, ma solo quello che è il bersaglio di una saccade immediatamente successiva può essere identificato, anche se i bersagli scompaiono prima che gli occhi inizino effettivamente a muoversi.²⁵

2.8 RANDOM DOTS MOTION KINEMATOGRAM

Con il termine *Random Dots Motion kinematogram* (kRDM, dal greco “kinema”, “kinematos” movimento + gramme, linea) si intende una tecnica sperimentale di indagine utilizzata per studiare i meccanismi neuronali dei processi decisionali, utilizzata principalmente a livello dei primati ma anche in altre specie animali e nell’uomo.³⁰ I kRDM sono dei modelli di punti casuali presentati in sequenza, ognuno con una forma e un’area ben definita all’interno della quale si muovono dei punti coerentemente in una determinata direzione e altri punti in modo casuale e in rapida successione.³¹

Si è discusso a lungo su quali siano i meccanismi neuronali che danno luogo alla percezione visiva del moto e della forma di questi stimoli kRDM. Al giorno d’oggi si sa che i fotoni che arrivano nella retina generano dei potenziali d’azione nelle cellule gangliari, le quali proiettano nel talamo, e da lì nella corteccia visiva primaria (V1). Ciascun neurone di V1 possiede un piccolo campo recettivo, che corrisponde a una porzione limitata del campo visivo dove il neurone si attiva solo se un particolare stimolo è posto al suo interno. I neuroni di V1 processano vari aspetti degli stimoli visivi, come i bordi delle superfici, e poiché tutta l’informazione visiva passa da V1, si può affermare che il resto del nostro sistema visivo elabora informazioni processate da V1. Da V1, inoltre, originano due diversi flussi di aree visive, che elaborano aspetti progressivamente più complessi degli stimoli visivi. Le aree del flusso ventrale, che terminano nel lobo temporale, processano l’identità dello stimolo visivo, in modo tale da riconoscerlo. Le aree del flusso dorsale, invece, che terminano nel lobo parietale, processano gli aspetti spaziali e temporali dello stimolo visivo, in modo da riuscire a localizzarlo. Queste ultime sono anche le aree del sistema visivo più direttamente legate all’iniziazione del movimento, in particolare del movimento oculare.³⁰

La struttura della rete neurale è quindi costituita da due percorsi di elaborazione, corrispondenti alle vie visive ventrali e dorsali, con dei percorsi di tipo piramidale, ovvero dove i livelli successivi rappresentano concetti sempre più astratti. Il percorso del movimento, ad esempio, riconosce i moti affini, mentre il percorso della forma è costituito da livelli che combinano le informazioni sui bordi per rilevare forme geometriche semplici. Poiché la forma e il movimento vengono elaborati in diverse aree del cervello, il recupero della forma dal movimento è un esempio particolarmente importante del fatto che certe aree siano collegate. Il sottoinsieme della gerarchia di elaborazione del movimento è costituito da uno strato di neuroni sensibili al movimento, seguito da due strati di neuroni di rilevamento della traslazione, corrispondenti rispettivamente alle aree visive V1, MT (movimento locale) e MST (movimento globale). La gerarchia semplificata di elaborazione delle forme, che rileva forme quadrate e diamantate, è costituita da due strati di rilevatori di bordi di primo e secondo ordine

(quattro direzioni, una scala) e due strati di rilevatori di forme, corrispondenti rispettivamente alle aree visive V1 e V2 (bordi), V4 (forma locale) e IT (forma globale) (Figura 4).³²

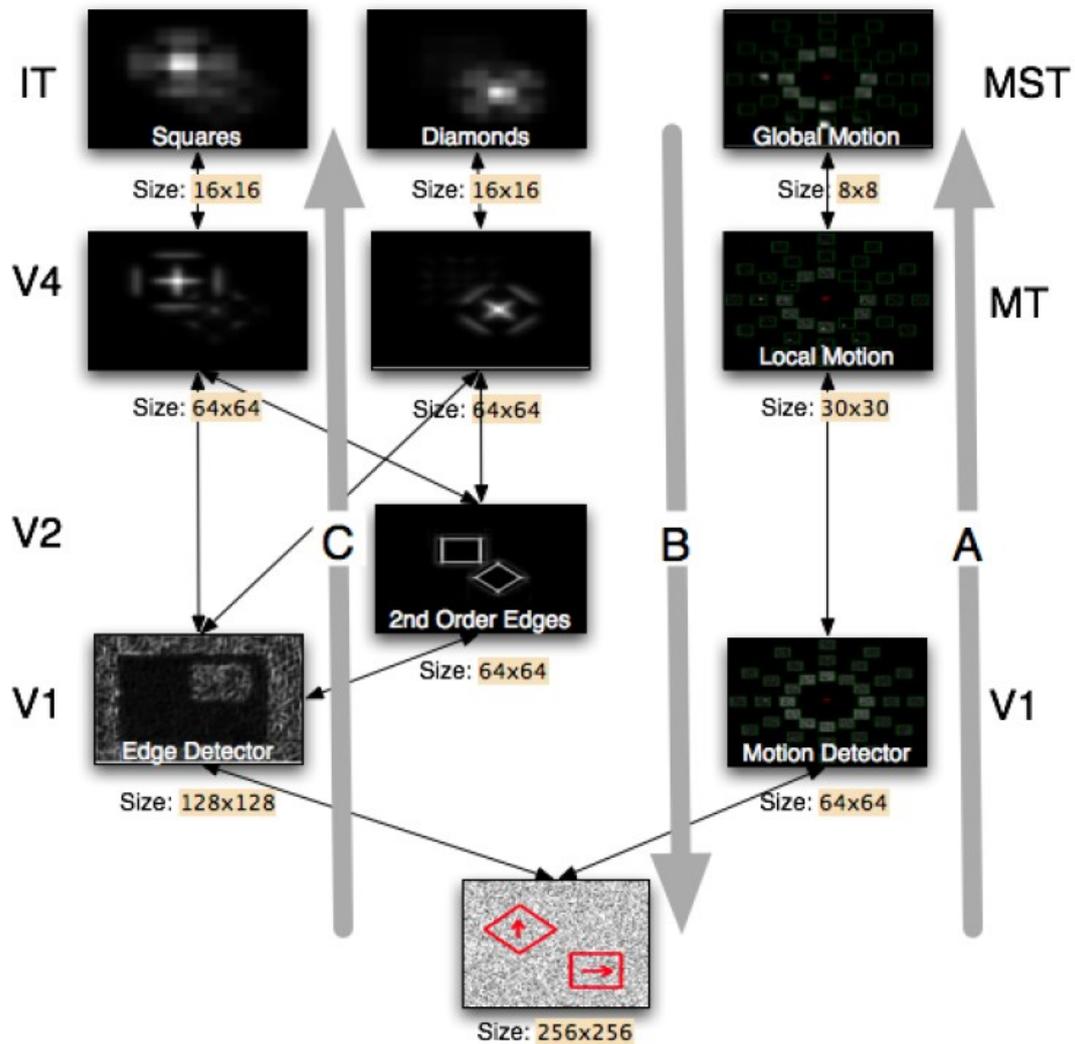


Figura 4. Schema della rete neurale. Sul lato sinistro c'è il percorso di riconoscimento della forma, mentre sul lato destro il percorso del movimento. Le frecce mostrano il flusso di informazioni.³²

Per quanto riguarda specificamente la percezione del movimento, è di fondamentale importanza l'area detta MT (medio-temporale). Così come in V1, anche i neuroni dell'area MT possiedono un campo recettivo, con un diametro più grande. La loro caratteristica principale è di avere una direzione di movimento preferita: ciascun neurone si attiva solo se è presente uno stimolo visivo nel suo campo recettivo e se tale stimolo si muove nella sua direzione preferita. I neuroni dell'area MT non hanno memoria: la loro attività in ogni istante dipende solo dalla posizione e dalla direzione del movimento dello stimolo. Globalmente, i campi recettivi e le direzioni preferite della popolazione neuronale dell'area MT ricoprono l'intero campo visivo e 360° di direzioni del movimento, cosicché, se si potesse registrare simultaneamente l'attività di tutti i neuroni di quest'area, si otterrebbe istantaneamente un'informazione accurata degli stimoli visivi in movimento davanti al soggetto. Tutto ciò indica che l'attività neuronale dell'area MT è necessaria ma non sufficiente perché venga

percepita la direzione del moto del kRDM. È quindi necessario che un'altra popolazione neuronale processi l'integrazione dell'attività neuronale registrata. Una serie di esperimenti mostra che questa funzione viene eseguita mediante l'attività dei neuroni dell'area intra-parietale laterale (LIP). Tale regione cerebrale, quindi, può essere considerata l'interfaccia tra il sistema visivo e quello oculomotorio, e anche i neuroni di LIP rispondono a stimoli in una zona limitata del campo visivo.³⁰

Tramite il metodo kRDM di creazione di schemi di punti casuali in movimento, impiegato negli studi psicofisici e fisiologici, è inoltre possibile esaminare la capacità di percepire la direzione di un oggetto in movimento nell'ambiente circostante.³³

Uno stimolo di tipo kRDM è costituito da una sequenza di diversi fotogrammi in cui i punti si muovono seguendo un algoritmo costruito per determinare la direzione e la velocità percepite ad un certo livello di coerenza: ad esempio, si ha una coerenza del movimento del 40% quando il 40% dei punti si sposta in una determinata direzione del segnale, da un fotogramma all'altro della sequenza, mentre l'altro 60% dei punti (i cosiddetti punti di rumore, di sfondo) si muove in modo casuale (Figura 5). La coerenza e la facilità nel percepire la direzione del movimento sono proporzionali, in quanto maggiore è la coerenza più facile sarà percepire la direzione del movimento nella sua totalità. La soglia di coerenza necessaria alla discriminazione del movimento è definita come il numero minimo di punti di segnale necessari per rilevare o identificare in modo affidabile la direzione del movimento globale.³³

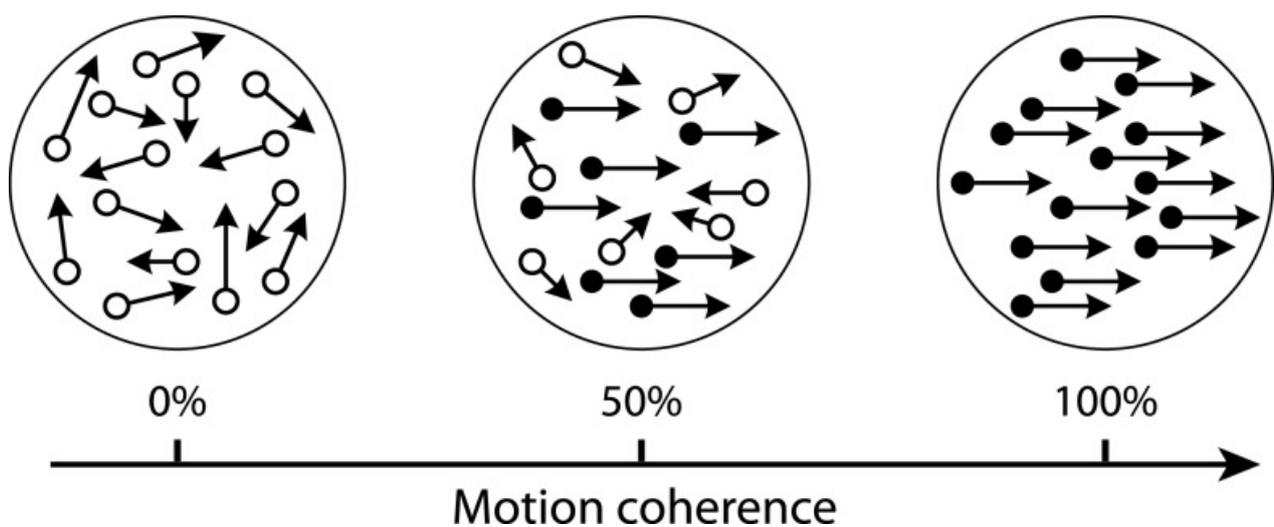


Figura 5. Esempio della percentuale di coerenza del movimento nel modello kRDM.³⁴

Esperimenti psicofisici e neurofisiologici basati su stimoli RDM hanno aiutato a comprendere i meccanismi alla base della percezione del movimento, del processo decisionale sul movimento, dell'apprendimento percettivo, della discriminazione della direzione, della trasparenza del movimento, della memoria di lavoro del movimento e della percezione della profondità dal movimento. Lo stimolo kRDM, quindi, è fondamentale per comprendere molti aspetti legati alla percezione del movimento, sebbene tuttavia esistano una grande varietà di stimoli kRDM che rendono complicato il confronto diretto tra i vari studi che possono essere effettuati.

Gli stimoli kRDM, infatti, variano non solo nei loro parametri come velocità, durata, contrasto di luminosità e dimensione dei punti di segnale, ma anche negli algoritmi che li generano. Vari studi hanno esaminato se le differenze a livello algoritmico dello stimolo kRDM fornito influenzino o meno la percezione della direzionalità del movimento nell'essere umano: gli obiettivi sono stati quelli di valutare la capacità dei soggetti umani di stimare la direzione degli stimoli kRDM in base a diversi parametri di durata, velocità, contrasto, dimensione dei punti, spostamento spaziale e spostamento temporale. La conclusione tratta dagli studi è che non esiste una relazione coerente tra algoritmi differenti, e le prestazioni possono differire notevolmente tra diversi algoritmi e al modificarsi dei diversi parametri sopra citati.³³

2.8.1 DIFFERENZE TRA BAMBINI, ADULTI E ANZIANI NEI KRDM

Gli esseri umani non soltanto rispondono diversamente a seconda delle differenze negli stimoli che vengono presentati, ma si hanno risposte diverse anche in modo dipendente dall'età dei soggetti interessati, in correlazione con le funzionalità del proprio sistema visivo.

Ad esempio, la sensibilità dei bambini di 3 mesi di stimoli kRDM è stata valutata misurando le soglie di coerenza necessarie per poter attuare la discriminazione del movimento dei punti che sono stati presentati. Nello studio interessato, sono stati presentati dei punti che si muovevano in modo coerente con una dimensione di spostamento di $0,16^\circ$ (velocità $8^\circ/s$), con una direzione di movimento che si invertiva periodicamente. È stato dimostrato che sia per i neonati che per i soggetti adulti le soglie di coerenza diminuiscono con l'aumentare della durata dell'intervallo tra le inversioni di direzione dei punti, tuttavia, i neonati richiedevano dei tempi decisamente più lunghi per poter estrarre la direzione del movimento. Anche nelle migliori condizioni, i neonati sono stati marcatamente meno sensibili, con soglie di coerenza di circa il 50%, rispetto alla soglia di 5-7% che si è verificata per l'adulto.³⁵

Un ulteriore esperimento è stato realizzato approfondendo la differenza di percezione del movimento tra bambini in condizioni normali e bambini con disturbo dello spettro autistico (ASD), in modo da

evidenziare delle eventuali differenze dovute a uno stato patologico. In questo studio, 25 bambini con ASD (età media 11 anni, 8 mesi) e 22 bambini in via di sviluppo, abbinati per capacità mentale non verbale ed età cronologica, sono stati tenuti a rilevare la direzione dei punti in movimento con uno stimolo kRDM. Lo studio ha dimostrato che i bambini con ASD hanno soglie di coerenza del movimento più elevate rispetto ai bambini senza disturbo: ciò significa che i bambini con ASD necessitano di una percentuale più alta di punti che si muovono in modo coerente per rilevare una direzione coerente nel movimento in movimento, e che quindi tale condizione patologica può influenzare la percezione visiva del soggetto.

Le soglie di coerenza statica della forma, invece, non erano elevate in questi stessi bambini; pertanto, si è concluso che è la percezione del movimento ad essere compromessa nell'ASD, probabilmente attraverso carenze a livello del flusso dorsale. Lo studio ha mostrato una soglia media di discriminazione della coerenza del movimento di circa il 25% nei bambini con ASD rispetto al 15,3% nei bambini in via di sviluppo. Nonostante lo studio effettuato, è comunque necessario svolgere un lavoro più adeguato per indagare ulteriormente l'elaborazione visiva di basso livello nell'autismo.³⁶

Per quanto riguarda gli anziani, invece, un deficit in varie funzioni visive con l'aumentare dell'età è stato riportato in molti studi. In uno studio, state esaminate le differenze per ciò che concerne la soglia di coerenza per la discriminazione del movimento in uno stimolo di tipo kRDM tra adulti e anziani, osservando dei peggioramenti a livello visivo con l'aumentare dell'età. Sono stati presi in considerazione due gruppi: un gruppo di trentadue soggetti più anziani (età media 61,5 anni) e trentadue più giovani (età media 23,2 anni).³⁷

Trick e Silverman hanno misurato la soglia di coerenza del movimento in osservatori di età compresa tra 25 e 80 anni, dimostrando che le soglie di coerenza sono aumentate con l'età dell'1,36% per decennio.³⁸

Pertanto, sembra esserci un accordo generale sul fatto che le prestazioni riguardanti la coerenza del movimento si deteriorino con l'età; tuttavia, le prove potrebbero non essere così convincenti come potrebbero sembrare a prima vista, data la serie piuttosto mista di risultati finora riportati e la mancanza di uno sguardo sistematico su come variabili come la velocità del segnale di movimento potrebbero influenzare l'elaborazione del movimento.

Nello studio interessato, all'osservatore è stato presentato un singolo kRDM contenente punti di segnale che sembravano muoversi in direzione verso l'alto o verso il basso, ed è stato chiesto di indicare se percepivano che i punti del segnale si muovevano verso l'alto o verso il basso. Se il

giudizio di direzione dell'osservatore era corretto, il grado di moto coerente (cioè il rapporto segnale-rumore) sarebbe stato diminuito di 1 dB, mentre in caso contrario ci sarebbe stato un aumento del grado di moto coerente di 3 dB.

Lo studio ha dimostrato un significativo effetto principale dell'età dei partecipanti sulle loro soglie di coerenza e un significativo effetto principale della velocità di stimolo. È stato anche riscontrato un significativo effetto principale di genere: i maschi avevano soglie più basse (16,6%) rispetto alle donne (25,1%). Non ci sono state, tuttavia, interazioni significative tra velocità di stimolo e sesso del partecipante, o età e sesso del partecipante.

Lo studio è in linea con la maggior parte dei risultati precedenti, che riportano tutti che vi è un aumento delle soglie di coerenza con l'età. Tuttavia, questo è il primo studio a dimostrare che solo alcune velocità (quelle lente) sono influenzate: l'aumento delle soglie con l'età era limitato alle velocità più lente utilizzate, un risultato non precedentemente riconosciuto in letteratura a causa del semplice fatto che in tutti gli studi precedenti i test sono stati effettuati ad una singola velocità.³⁷

2.8.2 CAMPI D'UTILIZZO DELLA TECNICA KRDM

Come è stato enunciato precedentemente, lo stimolo kRDM è stato utilizzato per una serie molto ampia di studi, sia a livello umano che a livello animale, per ottenere tantissime considerazioni su come vengono elaborate determinate informazioni a livello cerebrale.

Per esempio, questa tecnica è stata utilizzata per studi che hanno cercato di risolvere il cosiddetto “*visual binding problem*”, ovvero il problema vincolante, che si riferisce alla codifica del rapporto tra i vari circuiti cerebrali per ottenere la combinazione di decisioni, azioni e percezioni. Questo approccio è stato realizzato tramite il modello “*Selective Tuning*”, ovvero un modello computazionale di attenzione visiva che integra percorsi in una rete in grado di prendere decisioni di alto livello e, attraverso una serie di processi WTA (winner-take-all), di identificare tutti i neuroni che hanno partecipato a quella decisione³⁹. La corteccia visiva è suddivisa in un gran numero di aree specializzate che elaborano diversi parametri, e questa elevata selettività delle varie aree corticali ha portato alle ovvie domande su come sia possibile che la percezione visiva sia unitaria, e quali siano i meccanismi responsabili.³²

Sono stati utilizzati stimoli kRDM coi punti presenti all'interno di 1 o 2 finestre, di forma quadrata o di diamante, che eseguono un movimento di traslazione in una o due direzioni diverse. Nel primo esperimento, relativo all'extrapolare la “forma dal movimento”, è presente un kRDM in una finestra

quadrata con un movimento di traslazione verso destra. In seguito allo stimolo, i punti in movimento verranno localizzati nel livello di input e i punti vicini saranno inibiti, come illustrato in Figura 6.A. Una volta che i neuroni vicini sono stati inibiti, i neuroni di V1 (atti a rilevare i bordi) rileveranno questi pseudo-spigoli e il percorso di riconoscimento della forma si attiverà, rilevando la presenza del quadrato nella sequenza di input. Allo stesso modo, la Figura 6.B illustra il risultato del rilevamento del movimento in una finestra a forma di diamante. Per testare le capacità del sistema attentivo di gestire più modelli di input, è stata utilizzata una sequenza di immagini contenente due regioni in movimento: una regione quadrata di punti in movimento verso destra e una regione a forma di diamante di punti in movimento verso l'alto. I neuroni MST si attiveranno indicando i due modelli di movimento incompatibili e il sistema attenzionale selezionerà i movimenti di livello superiore uno dopo l'altro, consentendo al sistema di rilevare prima uno, poi l'altra forma (Figura 6.C e 6.D).³²

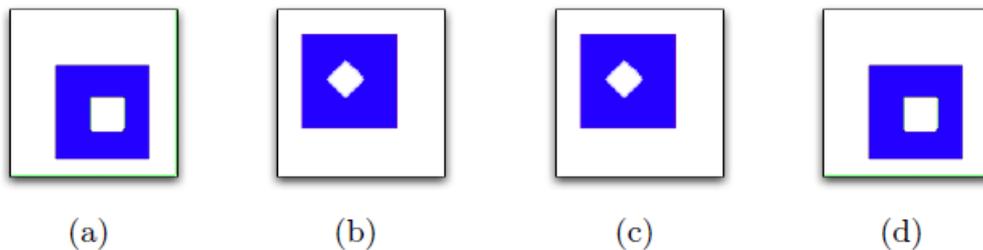


Figura 6. Finestre di selezione attentiva per gli stimoli kRDM. a) Stimolo singolo, Quadrato (b) Stimolo singolo, Diamante (c) Due oggetti, 1° fissazione (d) Due oggetti, 2° fissazione.³²

In un altro esperimento, gli stimoli kRDM sono stati utilizzati per addestrare soggetti con scotomi corticali a eseguire la discriminazione della direzione del movimento, ripristinando parzialmente la percezione del movimento visivo. È importante capire come le aree visive nei soggetti normali e nei soggetti che presentano scotomi corticali rispondono agli stimoli kRDM. Studi in soggetti normali hanno dimostrato che le risposte dipendenti dal livello di ossigeno nel sangue (BOLD) nell'area umana hV5/MT+ aumentano con l'aumentare della coerenza dello stimolo kRDM, in generale accordo con gli studi di elettrofisiologia eseguiti a livello dei primati. Tuttavia, le risposte allo stimolo kRDM che sono state ottenute negli studi precedenti sono relative al fatto che il soggetto eseguiva la fissazione, e non la discriminazione del movimento.

Per comprendere la differenza a livello della percezione del movimento visivo tra soggetti normali e soggetti con scotomi, nello studio si è partiti con stimoli kRDM di base con una coerenza dello 0%, isolando così facendo la componente della risposta BOLD dovuta specificamente all'integrazione spaziale dei segnali di movimento locali. Si è scoperto che le risposte nell'area hV5/MT+ di soggetti sani aumentavano monotonicamente quando i soggetti eseguivano la fissazione, mentre ciò non

accadeva quando i soggetti stavano eseguendo un compito di discriminazione della direzione del movimento dello stimolo kRDM, in quanto le risposte nell'area hV5/MT+ rimanevano piatte, cambiando minimamente in funzione della coerenza del movimento. Un modello simile di risposte è stato osservato nell'area hV5/MT+ di soggetti con scotomi corticali densi, che hanno eseguito la direzione della discriminazione del movimento con stimoli kRDM presentati all'interno dello scotoma: la presentazione passiva di kRDM all'interno dello scotoma non ha suscitato risposte significative hV5/MT+, e non è stata evidenziata una dipendenza dalla coerenza per quanto riguarda l'attivazione di hV5/MT+, pertanto queste osservazioni gettano ulteriore luce su come le risposte visive della corteccia si comportano in funzione della coerenza del movimento.⁴⁰

2.9 GLI STIMOLI KRDM E GLI ESPERIMENTI SUGLI ANIMALI

Il rilevamento e il conseguente utilizzo effettivo del movimento visivo è molto diffuso nel regno animale, per tantissimi aspetti. Esperimenti di investigazione dei meccanismi neurali di percezione del movimento sono stati condotti in molte specie come mosche, piccioni e scimmie⁴¹, e i circuiti neurali semplici capaci di rilevare il movimento locale di singoli elementi sono stati studiati nella retina di varie specie, come mosche⁴² e conigli.⁴³

Per tale motivo è divenuto comune l'utilizzo di modelli di kRDM, principalmente per valutare il movimento visivo, in quanto gli stimoli kRDM permettono lo studio della percezione motoria in situazioni molto diverse e riescono, per tale motivo, ad essere applicati in vari processi sperimentali sempre all'interno dell'ambito della percezione visiva. Meccanismi percettivi in grado di rilevare il movimento comune di molti elementi sono stati identificati nell'uomo e in altri primati, e sono stati localizzati a livello della corteccia extra-striata, ma rimane tuttavia una questione aperta: i primati possiedono capacità corticali uniche, o una tale organizzazione funzionale è una proprietà fondamentale dei sistemi visivi di tutti i mammiferi?

Se l'analisi del movimento visivo globale fosse una proprietà comune ai mammiferi, questo avrebbe sicuramente implicazioni riguardanti la sua evoluzione.⁴⁴ Pertanto, successivamente verranno considerati i vari utilizzi del modello kRDM, per ciò che concerne la valutazione del movimento visivo, per quanto riguarda molti animali, partendo dalle scimmie, che evolutivamente sono molto più simili all'uomo, fino ad arrivare all'analisi degli stimoli a livello di animali inferiori, come lo *Zebrafish* e, ovviamente, la *Drosophila*, il modello sul quale si è operato sperimentalmente all'interno di questa tesi.

2.9.1 KRDM NELLA SCIMMIA

In un esperimento effettuato sulle scimmie *rhesus* da Salzman, Britman e Newsome è stato analizzato come la micro-stimolazione a livello corticale nelle scimmie influenza i giudizi percettivi della direzione del movimento. Lo stimolo kRDM è stato utilizzato per lo studio del processo decisionale percettivo nelle scimmie *rhesus*, e il risultato ottenuto ha indicato che le proprietà fisiologiche misurate a livello neuronale possono essere causalmente correlate a un aspetto specifico delle prestazioni percettive.⁴⁵ I neuroni nell'area visiva temporale media (MT, chiamata anche V5) sono attivati da stimoli di movimento su larga scala. Il campo ricettivo di un neurone MT, cioè la regione dello spazio visivo che è sensibile agli stimoli del movimento, è considerevolmente più grande di quello di un neurone nella corteccia visiva primaria; diversi neuroni nella MT rispondono a diverse direzioni di movimento, ma proprio come in altre parti della corteccia visiva, l'area MT ha una struttura colonnare in modo che gruppi di neuroni vicini condividano campi ricettivi con una direzione di movimento preferita simile.⁴⁶

Nell'esperimento sono state utilizzate due diverse direzioni di movimento, verso l'alto o verso il basso, e la scimmia viene addestrata a indicare la direzione del movimento percepito dai movimenti oculari saccadici verso uno dei due bersagli presenti. All'inizio di una tipica sessione di registrazione con la presenza di un elettrodo extracellulare per la micro-stimolazione a livello della MT, la posizione del campo ricettivo e la direzione di movimento preferita di un singolo neurone viene determinata variando l'angolo di movimento e la posizione dello stimolo kRDM. Una volta determinate le proprietà ricettive dei neuroni locali, vengono utilizzate solo due diverse classi di stimoli, ovvero punti che si muovono coerentemente nella direzione preferita del neurone registrato e punti che si muovono coerentemente nella direzione opposta.

Dopo ogni presentazione di uno stimolo kRDM vengono accesi due target, uno in una posizione nella direzione del movimento dello stimolo, l'altro sul lato opposto. La scimmia viene addestrata a indicare la direzione del movimento dello stimolo con un movimento saccadico dell'occhio verso il bersaglio corrispondente. Dopo l'allenamento, la decisione percettiva tra il movimento di un punto nella direzione preferita della cellula (P) o nella direzione nulla (N) viene eseguita in modo affidabile dalla scimmia, se viene utilizzato uno stimolo privo di rumore in cui tutti i punti si muovono nella stessa direzione. Tuttavia, il compito diventa più difficile, se solo una piccola frazione di punti si muove in modo coerente in una delle due direzioni mentre il resto dei punti si muove in una direzione casuale. La performance comportamentale può essere valutata con la funzione psicometrica che rappresenta la percentuale di saccadi al bersaglio P in funzione della coerenza, dove la coerenza indica la frazione di punti coerentemente in movimento (Figura 7).⁴⁵

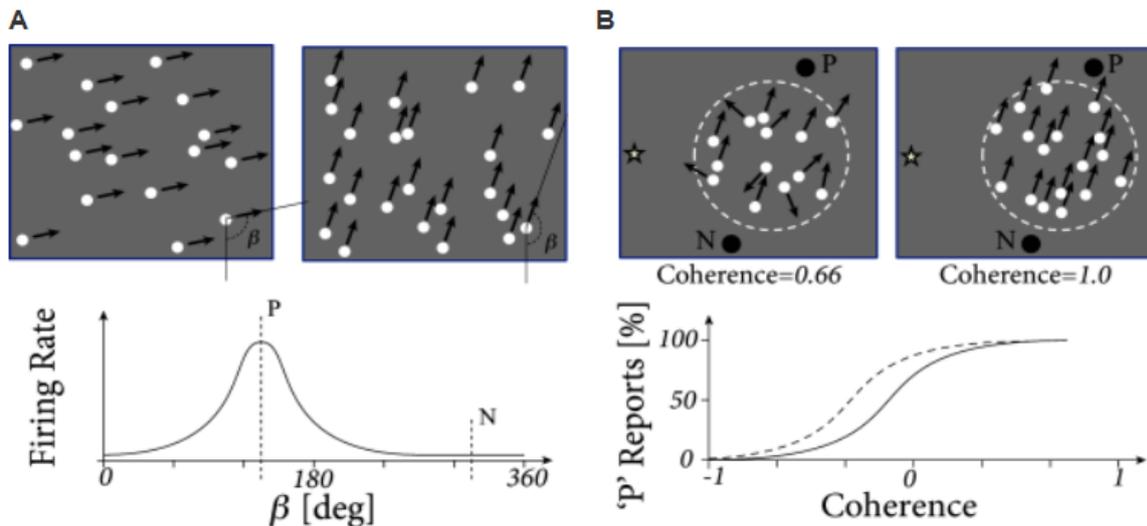


Figura 7. Stimoli puntiformi casuali e percezione del movimento. *A.* In alto: Un modello di punti casuali che si muovono in direzione β viene presentato sullo schermo. In basso: la risposta alla velocità di attivazione di un neurone nell'area MT dipende dalla direzione del movimento β dello stimolo casuale del punto. *B.* In alto: la scimmia fissa mentre uno stimolo kRDM viene presentato all'interno del campo ricettivo di un neurone. Dopo che la stimolazione visiva è disattivata, la scimmia indica con movimenti oculari a uno dei due bersagli se il movimento percepito è nella direzione "P" o "N". In basso: la percentuale di rapporti 'P' (asse verticale) in funzione della coerenza (asse orizzontale) dello stimolo (linea continua). La coerenza di 1 indica che tutti i punti si muovono nella direzione P, mentre la coerenza di 0,66 indica che un terzo dei punti si muove in una direzione casuale. La coerenza di -1 indica un moto coerente nella direzione 'N'.⁴⁷

L'elettrodo presente a livello della MT non viene utilizzato solo per registrare l'attività neurale, ma anche per stimolare un gruppo di neuroni nelle vicinanze dell'elettrodo. Poiché i neuroni vicini hanno direzioni di movimento preferite simili, l'iniezione di corrente nell'elettrodo può influenzare la percezione della scimmia a favore della direzione preferita dei neuroni, nonostante lo stimolo kRDM non presenti alcuna coerenza o ne abbia solo una piccola quantità. Ciò indica che la decisione percettiva della scimmia si basa sulle informazioni di movimento rappresentate nell'attività dei neuroni della MT. Mentre la decisione percettiva della scimmia è influenzata dalla manipolazione dei neuroni della MT, questo risultato non implica che la decisione stessa sia presa nella MT, ma è probabile che venga fatto in una fase successiva, in un'area che utilizza le informazioni dei suoi neuroni. Il risultato è coerente con l'idea che la micro-stimolazione focale migliora la rappresentazione sensoriale di una direzione del movimento rispetto ad altre.⁴⁵

Un altro interrogativo che è stato posto, e che è stato possibile analizzare sempre mediante uno stimolo kRDM, è il seguente: se la decisione non viene presa a livello della MT, come è stato specificato precedentemente, dove viene presa? Al momento questa informazione non è del tutto compresa, sebbene un'osservazione interessante sia stata analizzata nell'area intra-parietale laterale (LIP) durante esperimenti di processo decisionale percettivo, sempre tramite l'utilizzo di uno stimolo kRDM.⁴⁸ L'area LIP è un'area situata nel flusso di elaborazione visiva, tra la corteccia visiva primaria e la regione del campo oculare frontale, ed è coinvolta nel controllo dei movimenti oculari saccadici.

I neuroni nell'area LIP rispondono durante la preparazione dei movimenti oculari saccadici, ed essendoci diversi neuroni dell'area LIP questi possiedono a loro volta un campo ricettivo diverso, del quale la posizione corrisponde a una potenziale regione target dei movimenti oculari. In altre parole, un neurone LIP risponde appena poco prima che si verifichi un movimento oculare saccadico nel suo campo ricettivo, mostrando un'attività di tipo predittiva.⁴⁹

Le scimmie che sono state analizzate in questo esperimento, condotto da Roitman e Shadlen, sono state addestrate a indicare la direzione di uno stimolo kRDM mediante movimenti oculari saccadici verso uno dei due bersagli visivi. Il primo bersaglio si trova nel campo ricettivo di un neurone LIP, pertanto ci si aspetta che il neurone registrato risponda ogni volta che la scimmia prepara un movimento verso il primo bersaglio. Il secondo bersaglio, invece, si trova nella direzione opposta, per cui il compito è progettato in modo tale che uno stimolo kRDM che si muove in direzione del primo bersaglio indica che la scimmia dovrebbe fare un movimento oculare verso di esso, e che la risposta corretta a uno stimolo che si muove nella direzione opposta è una saccade al secondo bersaglio. La difficoltà del compito può essere variata cambiando la percentuale che si muovono in modo coerente, e il tempo di reazione comportamentale della scimmia è stato misurato in funzione della coerenza dello stimolo kRDM. Allo stesso tempo, è stata registrata l'attività dei neuroni dell'area LIP. Roitman e Shadlen hanno scoperto che, durante la presentazione dello stimolo kRDM, l'attività dei neuroni dell'area LIP è aumentata. Il tasso di aumento dopo l'insorgenza dello stimolo era più alto per gli stimoli con un'elevata percentuale di coerenza rispetto agli stimoli con poca o nessuna coerenza. È importante sottolineare che, quando le risposte sono state mediate e allineate all'insorgenza della saccade, i neuroni dell'area LIP hanno sempre raggiunto lo stesso livello di attività poco prima di una saccade nel loro campo ricettivo.

Questi risultati sono coerenti con l'idea che la decisione di eseguire una saccade avvenga nel momento in cui i neuroni dell'area LIP raggiungono un valore di soglia. Per gli stimoli con un alto grado di coerenza, l'attività aumenta più rapidamente, la soglia viene raggiunta prima e i tempi di reazione sono più brevi rispetto agli stimoli con basso grado di coerenza. Pertanto, il documento di Roitman e Shadlen suggerisce che «un livello soglia di attività LIP sembra segnare il completamento del processo decisionale».⁴⁸

2.9.2 KRDM NEI TOPI E NEI RATTI

In un esperimento, la percentuale di coerenza necessaria per discriminare la direzione del movimento di uno stimolo di tipo kRDM è stata misurata sia nei topi che nei ratti.⁴⁴ Per determinare se i roditori hanno capacità di movimento visivo e substrati anatomici paragonabili ai primati, sono state confrontate le soglie di coerenza nei confronti dello stimolo kRDM con quelle degli esseri umani. Per facilitare il confronto con la visione umana, tre uomini hanno osservato gli stessi stimoli dalla stessa distanza, e sono stati utilizzati dei pulsanti per iniziare ogni prova e per registrare le loro decisioni su quale parte avesse lo stimolo positivo. Gli animali sono stati addestrati ad associare il nuoto allo stimolo positivo, indipendentemente dalla posizione sinistra/destra nella quale lo stimolo si presentava, con successiva fuga dall'acqua. L'addestramento, inizialmente, consisteva nell'addestrare il ratto o il topo a distinguere tra il 100% e lo 0% di coerenza. Per i ratti, la discriminazione doveva essere effettuata tra movimento coerente verso sinistra (negativo) e verso destra (positivo). Per i topi, invece, il compito richiedeva una discriminazione tra movimento orizzontale (positivo) e verticale (negativo). Le soglie di coerenza sono state quindi stabilite partendo da percentuali alte e riducendo man mano la percentuale di punti che si muovevano in modo coerente.⁴⁴

Il risultato ha messo in evidenza il fatto che tutti i ratti e i topi sono stati in grado di discriminare la direzione del movimento degli stimoli kRDM, e lo hanno fatto anche quando la coerenza era del 25% o inferiore, una soglia paragonabile a quelle dei gatti⁵⁰. I topi sono stati più difficili da addestrare e testare e non si comportano bene come i ratti, probabilmente perché possiedono una minore acutezza visiva e una minore sensibilità al contrasto, e ci si aspettava che non avrebbero avuto risultati simili ai ratti. Il fatto che abbiano avuto risultati simili potrebbe essere dovuto all'utilizzo di un compito "più facile", ovvero nel fatto che discriminare il movimento verticale da quello orizzontale potrebbe essere un compito più semplice rispetto al movimento verso sinistra rispetto a quello verso destra.

La conclusione dello studio ha rilevato che le soglie basse ottenute per la discriminazione della coerenza del movimento da parte dei roditori sono la prova di un meccanismo globale che potrebbe essere comune a tutti i mammiferi. Sebbene la soglia di coerenza più bassa per discriminare il movimento a livello dei ratti e dei topi occasionalmente raggiunga i livelli umani, i valori medi dei roditori (>>25%) sono stati 2-3 volte più grandi di quelli negli umani. Questi dati indicano che il sistema visivo dei primati e dei roditori è simile, in quanto entrambi possiedono dei sistemi di rilevazione del movimento e un sistema per estrapolare il movimento globale da un segnale rumoroso. Sebbene le capacità visive dei roditori siano più limitate rispetto ai primati, ci sono vantaggi nell'utilizzo di ratti e topi come modelli sperimentali per scoprire i meccanismi fondamentali alla base della percezione del movimento visivo.⁴⁴

2.9.3 KRDM NEI PICCIONI

Lo stimolo kRDM è stato utilizzato anche per quanto riguarda lo studio delle capacità visive degli uccelli. In un esperimento, ai piccioni e agli esseri umani è stato richiesto di discriminare la direzione del movimento in uno stimolo kRDM.⁵¹ Stimoli simili sono stati utilizzati per determinare le soglie sia nei piccioni che negli esseri umani, per fornire un confronto il più diretto possibile della sensibilità al movimento nelle due specie. Il vantaggio principale dell'uso di kRDM è che esaltano il meccanismo di rilevamento del movimento di base. Sono stati utilizzati 8 piccioni adulti con precedenti esperienze in attività che utilizzavano il touch screen, mentre 4 osservatori umani hanno partecipato allo studio, 2 degli autori e 2 soggetti naïf, tutti con una visione normale.

Gli stimoli kRDM per esseri umani e piccioni consistevano in due display a punti presentati fianco a fianco. La visualizzazione dello stimolo su un display consisteva in rumore di movimento casuale, ovvero una coerenza allo 0%, mentre sull'altro display si forniva un movimento parzialmente coerente a seconda dell'esperimento, che variava da 1% a 100%, con il movimento coerente che poteva essere in una delle quattro direzioni (sopra, sotto, sinistra, destra). Ogni stimolo kRDM consisteva in una sequenza di fotogrammi con una durata totale di 1 secondo per gli esseri umani, mentre per i piccioni il display è rimasto acceso fino a quando non è stato fatto un beccuccio allo schermo (in genere tra 1 e 3 secondi). La direzione del movimento e il lato contenente lo stimolo positivo variavano in modo casuale tra le prove in ogni sessione.⁵¹

Per i piccioni, le soglie di coerenza sono state determinate diminuendo e aumentando sistematicamente i livelli di coerenza dello stimolo positivo fino a quando l'accuratezza non è scesa al di sotto del 55% (serie discendenti) o è salita al di sopra del 70% (serie ascendenti), rispettivamente.

Per tutti i soggetti sono state stimate due soglie dalle funzioni di accuratezza ottenute. L'interpolazione lineare è stata utilizzata per determinare il punto in cui queste funzioni hanno attraversato le linee di precisione del 70% e del 55%. La soglia del 70% è stata selezionata per rappresentare il punto in cui lo stimolo positivo poteva essere chiaramente rilevato, ma la discriminazione era sufficientemente difficile da comportare un numero sostanziale di errori. La soglia del 55% è stata selezionata come soglia minima di rilevamento per lo stimolo positivo. Per i piccioni, le funzioni ottenute durante le serie ascendenti sono state utilizzate per calcolare le soglie del 70% e le funzioni ottenute durante le serie discendenti sono state utilizzate per calcolare le soglie del 55%. In ogni caso, i valori sono stati mediati attraverso le due determinazioni per ciascun uccello. Per gli osservatori umani, le soglie sono state calcolate a partire dalla singola funzione ottenuta per ciascun soggetto.

Per i 4 osservatori, le soglie del 70% sono state raggiunte a percentuali di coerenza del 5,2%, 1,9%, 6,1% e 7,2%, mentre le soglie del 55% erano rispettivamente all'1,3%, 1,1%, 3,3% e 2,0%. Per i piccioni, le soglie del 70% sono state raggiunte con coerenze del 31%, 34% e 60%, e le soglie del 55% rispettivamente con coerenze del 22%, 13,5% e 21%. Le soglie di coerenza per i piccioni erano, in media, otto volte superiori a quelle per gli osservatori umani.

I risultati supportano la tesi che i piccioni hanno una sensibilità al movimento molto più bassa e una resilienza molto più bassa al rumore dinamico rispetto agli esseri umani. Studi precedenti hanno suggerito lo stesso, ma si fornisce un supporto molto più forte per questa conclusione, dato che il nostro confronto tra sensibilità al movimento nei piccioni e negli esseri umani ha utilizzato stimoli che sono stati abbinati il più vicino possibile. Pertanto, i piccioni nello studio sono stati relativamente inefficienti nel rilevare il movimento coerente dei kRDM, anche se l'acquisizione della discriminazione era rapida. La sensibilità al movimento inferiore dei piccioni probabilmente può essere attribuita a una più scarsa integrazione del movimento spazio-temporale.⁵¹

2.9.4 KRDM NELLO ZEBRAFISH

In questo studio viene affrontata la discriminazione dei kRDM per la larva dello *Zebrafish*.⁵²

Quando stimolato dagli spostamenti del movimento globale, lo *Zebrafish* larvale segue la direzione generale del movimento, un comportamento definito “risposta opto-motoria”, innata in certe specie animali, e che si pensa sia importante per contrastare gli spostamenti involontari nei flussi che scorrono.

Tali rapporti comportamentali sono innati, non richiedono alcuna formazione e, quindi, facilitano notevolmente le procedure sperimentali. Si usa lo stimolo kRDM per sondare se lo *Zebrafish* larvale può accumulare prove sensoriali e utilizzare tali segnali per il processo decisionale, e che il comportamento è in stretto accordo con un “modello integratore con perdite limitate”.⁵²

Nell'esperimento sono stati proiettati stimoli kRDM con diversi livelli di coerenza sul pavimento di un'arena contenente un animale che nuota liberamente e monitorando il suo comportamento in tempo reale. Lo stimolo è stato proiettato in un circuito chiuso in modo tale che si muovesse sempre perpendicolarmente all'animale, indipendentemente dal suo orientamento corporeo. Ogni direzione di attacco suscitata nello *Zebrafish* è stata etichettata come corretta o errata a seconda che seguisse o si opponesse alla direzione del movimento, rispettivamente, e usando questa analisi, è stato osservato che le larve seguivano robustamente la direzione del movimento coerente in questo contesto.

Si è prima mostrata la coerenza dello 0% come stimolo di base (nessun movimento coerente) e poi sono stati cambiati bruscamente i livelli di coerenza, verso destra o verso sinistra rispetto all'orientamento del corpo del pesce. Dopo un po' di tempo, i livelli di coerenza sono scesi di nuovo allo 0%. Ogni punto, non importa se statico o in movimento, ha avuto una vita breve, è scomparso stocasticamente e immediatamente riapparso in una posizione casuale.

È importante sottolineare che con l'aumentare dei livelli di coerenza aumenta l'accuratezza delle decisioni e la precisione degli attacchi corretti e gli intervalli tra i vari attacchi si accorciano. Inoltre, per ogni livello di coerenza testato, la precisione è migliorata nel tempo e nelle nuotate consecutive, indicando che le decisioni si basano su una qualche forma di integrazione temporale e che i singoli attacchi di nuoto non ripristinano del tutto l'integrazione precedentemente acquisita (Figura 8).

Per verificare se l'integrazione avviene a livello sensoriale o motorio, ci si è concentrati sul primo attacco dopo l'insorgenza dello stimolo in ogni prova, ed è stato riscontrato che le prestazioni sono migliorate con l'aumento del "periodo di ritardo": questo può essere spiegato solo dall'integrazione sensoriale e non dall'integrazione motoria, poiché l'attacco precedente, prima dell'inizio dello stimolo, avviene in una direzione casuale rispetto allo stimolo. In modo simile, è stato quantificato il primo attacco dopo la fine della stimolazione e mostra che la memoria del movimento decade lentamente durante la quiescenza. Infine, si è scoperto che a una coerenza costante dello 0%, gli animali mostrano una maggiore probabilità di selezionare curve consecutive nella stessa direzione, che potrebbe essere spiegato da un modello in cui le decisioni si basano sul segno lentamente fluttuante di un integratore che perde che opera sul rumore.

Questi risultati indicano che lo *Zebrafish* larvale che nuota liberamente può integrare le prove di movimento durante la quiescenza e durante le nuotate consecutive.⁵²

Le analisi comportamentali e la modellazione suggeriscono che lo *Zebrafish* larvale che nuota liberamente integra effettivamente temporalmente le prove di movimento, che usano tali informazioni per guidare le decisioni del nuoto.⁵²

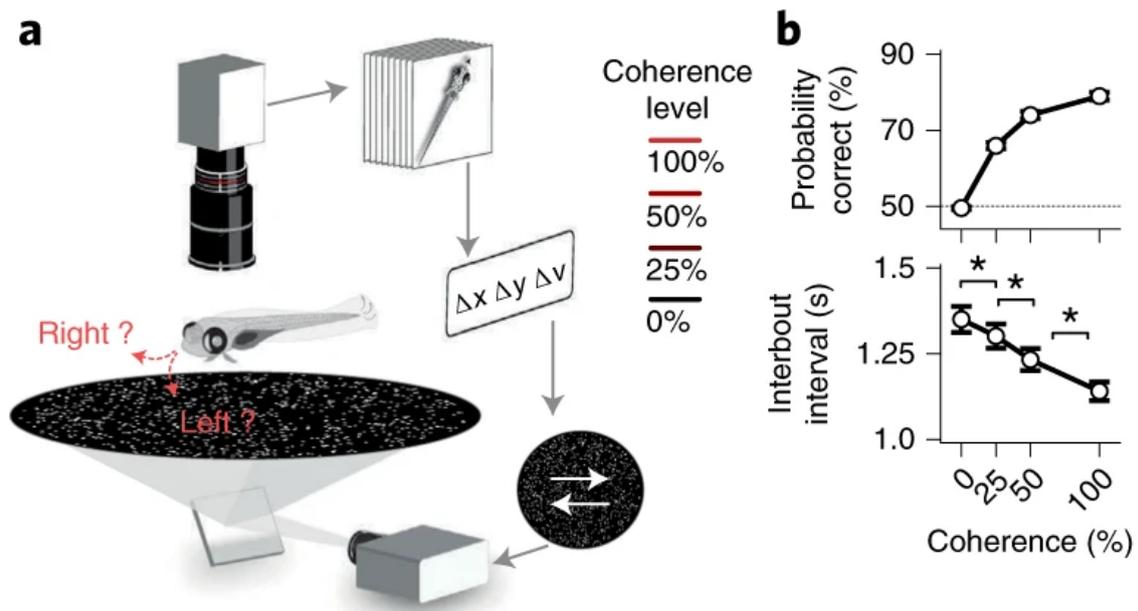


Figura 8. *A) kRDM presentati dal basso allo Zebrafish larvale che nuota liberamente. Dopo alcuni secondi di coerenza dello 0%, una certa percentuale dei punti si muove in modo coerente verso sinistra o verso destra a velocità costante fino al cambiamento dei livelli di coerenza. Ogni punto ha una durata di poche centinaia di millisecondi, rendendo impossibile per le larve tracciare i singoli punti nel corso del processo. Il sistema opera in un circuito chiuso in modo che i punti si muovano sempre perpendicolarmente al pesce.. Le dimensioni non sono in scala (la lunghezza del corpo di uno Zebrafish larvale è di circa 4 mm; il diametro dell'arena è di 12 cm). **b.** Accuratezza e intervallo tra incontri in funzione della forza di coerenza.⁵²*

3. IL MODELLO: DROSOPHILA MELANOGASTER

3.1 DROSOPHILA, MODELLO ANIMALE

Per organismo modello si intende un essere vivente semplice, e accessibile per studi di vario tipo in ambito scientifico. Tutti gli organismi modello che vengono utilizzati devono possedere delle caratteristiche precise: le dimensioni devono essere ridotte, devono esserci tempi brevi di riproduzione, e deve essere presente un genoma dal quale è possibile ottenere sia sequenziamento che manipolazioni genetiche. Un organismo modello viene utilizzato per studiare particolari fenomeni biologici, in modo da ottenere informazioni scientifiche che poi possono essere successivamente trasferite a organismi più complessi: questo è possibile in quanto i processi biologici fondamentali come il metabolismo, la regolazione, il ciclo cellulare e lo sviluppo embrionale, e i geni che li controllano, sono complessivamente conservati nel corso dell'evoluzione.⁵³

Drosophila melanogaster è un insetto a due ali che appartiene ai Ditteri, l'ordine delle mosche. Conosciuto comunemente come il moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster* è attualmente uno degli organismi modello più utilizzati a livello scientifico. Il suo costo contenuto, i tempi di generazione rapidi e le molteplici possibilità dal punto di vista genetico hanno reso questo animale indispensabile per la ricerca di base. *Drosophila* viene utilizzata come modello in tantissimi campi, dallo studio delle malattie umane fino allo studio del comportamento e dell'invecchiamento, data la presenza di un sistema nervoso centrale complesso.⁵⁴



Figura 9. *Drosophila melanogaster*.⁵⁵

Drosophila è ottima per lavorare, perché economica e facile da mantenere, e viene comunemente usata nelle classi di biologia per dimostrare i principi di base della genetica e dell'ereditarietà. Inoltre, ci sono pochissime restrizioni sull'utilizzo non essendoci particolari problemi etici o di sicurezza. Ogni femmina di *Drosophila* può deporre fino a circa 100 uova al giorno per un massimo di 20 giorni, e sono necessari circa 10 giorni a 25°C perché un embrione si sviluppi in una mosca adulta fertile, quindi è relativamente facile generare un gran numero di embrioni o mosche per un approccio sperimentale. Sebbene sia comunemente indicato come un moscerino della frutta e spesso trovato in natura intorno a vigneti e frutteti, *Drosophila* in realtà mangia i lieviti che crescono sul frutto.⁵⁶

Drosophila viene utilizzata come modello anche nel processo clinico di scoperta di farmaci, per testare gli effetti di determinati farmaci su attività riguardanti la rigenerazione dei tessuti come la divisione cellulare, la differenziazione e il movimento. Nuovi farmaci possono essere testati in *Drosophila* molto più velocemente che nei modelli di mammiferi, e inoltre, quando si utilizza *Drosophila*, è facile manipolare il background genetico per imitare uno “stato malato” per testare l'efficacia del farmaco in quel determinato contesto.⁵⁶

Drosophila è utilizzata anche e soprattutto per studiare le malattie del cervello umano, e per osservare i processi comportamentali, sia semplici che complessi, o di apprendimento e di memoria. Questo modello offre un'ampia varietà di strumenti che possono potenzialmente affrontare alcune questioni in sospeso alla base di varie condizioni neurologiche, tra le quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Leigh, la sclerosi tuberosa, l'epilessia e lesioni del SNC.⁵⁷

Uno svantaggio dell'utilizzo di *Drosophila* è il rischio che fattori patogenetici siano specifici dei vertebrati: ad esempio, le malattie immunologiche come la sclerosi multipla non possono essere analizzate in modo convincente mediante *Drosophila*, oppure condizioni patologiche come gli infarti cerebrali e l'emorragia cerebrale, che non possono essere analizzati perché mancano i vasi, mentre le cellule del sangue sono principalmente limitate agli emociti primitivi. La maggior parte dei modelli di *Drosophila* riproduce alcuni aspetti delle malattie umane, ma occorre tenere conto che le differenze tra mammiferi e invertebrati rappresentano potenziali inconvenienti nella modellizzazione delle malattie cerebrali e non solo.⁵⁷

3.1.1 L'ASPETTO DI DROSOPHILA

Drosophila melanogaster possiede diverse sezioni anatomiche: testa, corpo, zampe e ali. La testa è tonda e sono presenti occhi rossi composti, le antenne sono corte e la bocca è sviluppata per assorbire liquidi. Inoltre, possiede un singolo paio di ali emergenti dalla parte mediana del torace, mentre dalla parte terminale emergono degli organi di bilanciamento chiamati alteri.⁵⁸ Il corpo è di colore giallo-marrone e sono presenti degli anelli neri trasversali che si intervallano a livello dell'addome. È presente un netto dimorfismo dal punto di vista sessuale: le femmine di *Drosophila* sono lunghe circa 2,5 millimetri, mentre i maschi sono leggermente più piccoli e la parte posteriore del loro corpo è marcatamente più scura. I due sessi, quindi, sono facilmente distinguibili sia in base alle differenze di colore che dalla presenza di determinati “pettini”, cioè una fila di setole scure presenti a livello del tarso della prima zampa. Inoltre, i maschi possiedono un cluster di peli appuntiti che circondano i genitali, e vengono utilizzati per attaccarsi alla femmina durante l'accoppiamento. (Figura 10).⁵⁹



Figura 10. A sinistra un maschio di *Drosophila*, a destra una femmina. Si notano le differenze a livello della parte terminale dell'addome e le maggiori dimensioni della femmina.⁶⁰

3.1.2 IL CICLO VITALE

Il ciclo vitale di *Drosophila melanogaster* comprende principalmente quattro fasi: uovo, larva, pupa e adulto. La durata del tempo di sviluppo, ovvero il tempo necessario affinché un uovo maturi in adulto, varia rispetto alla temperatura circostante, che è una caratteristica di tutti gli insetti a sangue freddo. Se tenuto a temperatura ambiente (25°C), un uovo di *Drosophila* richiede 8,5 giorni per svilupparsi in un adulto; a temperature superiori a questa, il tempo di sviluppo è maggiore a causa dello stress dato dal calore. Le quattro fasi dello sviluppo, espresse nella Figura 11, sono:

- 1) Uovo: la grandezza è di circa 0,5 mm. Una femmina può deporre fino a 400 uova in un terreno di deposizione favorevole (ad esempio un frutto). Entro 24 ore dalla deposizione, le uova si

schiudono giungendo al primo stadio larvale. A temperatura ambiente, il tempo di schiusa è di appena 15 ore;

- 2) Larva: lo stadio larvale di questo insetto è costituito da tre stadi. Entro 24 ore dalla schiusa, la larva muta per svilupparsi e arrivare al secondo stadio larvale. Successivamente, dopo altre 24 ore, la larva muta e matura fino al terzo stadio larvale, perdendo spiracoli, bocca e uncini;
- 3) Pupa: dopo 4 giorni di alimentazione, la larva al terzo stadio si incapsula all'interno di un pupario duro e di colore scuro. È in questa fase pupale, dove avviene la metamorfosi di *D. melanogaster*, dando origine ad ali e gambe. A temperatura ambiente, la durata della metamorfosi dura 4 giorni;
- 4) Adulto: *D. melanogaster* adulto emerge attraverso l'opercolo del pupario. Entro 8–12 ore dalla nascita, la mosca femmina è già fertile, quindi è libera di accoppiarsi con il maschio per circa 30 minuti, durante i quali il maschio insemina centinaia di spermatozoi all'interno della femmina, che li immagazzina e li usa per deporre le uova, con una probabilità di del 50% ottenere figli maschi e femmine.⁶¹

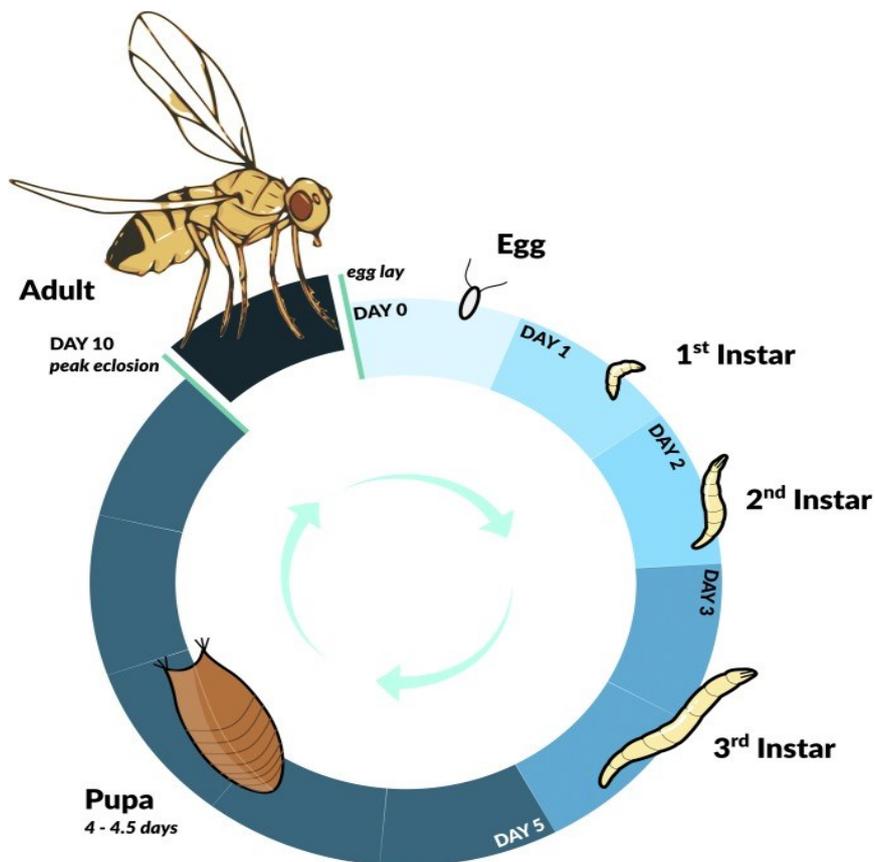


Figura 11. Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*.⁶²

3.2 DROSOPHILA, MODELLO GENETICO

La divergenza anatomica tra *Drosophila* e l'uomo è evidente, ma le vie molecolari fondamentali sono altamente conservate. Il sequenziamento del genoma di *Drosophila* ha rivelato circa 13.600 geni, numero decisamente inferiore rispetto al genoma umano, ma d'importanza fondamentale.⁵⁷

Nel 1999, infatti, è stato utilizzato il genoma di *Drosophila* come banco di prova per dimostrare la praticità dell'approccio shotgun per il sequenziamento del genoma umano, approccio che si è rivelato corretto e ha fatto sì che venisse rilasciata la sequenza del genoma di *Drosophila* nel marzo del 2000, non molto prima rispetto al completo sequenziamento del genoma umano.⁶³

La sequenza del genoma di *Drosophila* è liberamente disponibile ed è accessibile tramite "Flybase", un database online dedicato a *Drosophila*. I confronti tra *Drosophila* completamente sequenziata e il genoma umano hanno rivelato che circa il 75% dei geni noti delle malattie umane ha una corrispondenza riconoscibile nel genoma di *Drosophila*, consolidando la sua legittimità come organismo modello per la ricerca medica.⁵⁶

C'è stata una lunga storia di utilizzo della *Drosophila* a livello genetico come strumento per comprendere la biologia risalente agli esperimenti di Thomas Hunt Morgan oltre 100 anni fa. Una convenzione in *Drosophila*, che Morgan ha iniziato, è quella di nominare le mutazioni per riflettere la natura del loro fenotipo (ovvero, gli effetti osservabili della mutazione). Ad esempio, una delle prime mutazioni isolate da Morgan è nota come *white*; le mosche con questa mutazione hanno occhi bianchi, invece che rossi.⁵⁴ Morgan, inoltre, ha utilizzato *Drosophila* per dimostrare la teoria dell'ereditarietà cromosomica, dimostrando che il gene *white* risiede sul cromosoma X, scoperta per la quale ha ricevuto un premio Nobel.⁶⁴

Molti geni inizialmente caratterizzati in *Drosophila* sono stati successivamente isolati e studiati nei topi e negli esseri umani, e i nomi delle mosche sono stati adattati. Un esempio di questo è *Notch* (ci sono 4 geni *Notch* nei mammiferi, *Notch1-4*). Tuttavia, se un gene ortologo è stato caratterizzato in altri sistemi modello prima che gli alleli mutanti siano stati isolati nella mosca, allora il nome stabilito viene poi successivamente adottato in *Drosophila*. A tutti i geni di *Drosophila* è stato dato un "numero CG" durante l'annotazione della sequenza del genoma, e ci sono ancora molti geni non caratterizzati senza mutazioni o ortologhi noti a cui si fa riferimento con un numero CG (ad esempio, CG10026).⁵⁶

3.2.1 IL GENOMA DI DROSOPHILA

Drosophila Melanogaster possiede quattro serie di cromosomi: i cromosomi sessuali X e Y, due cromosomi autosomici 2 e 3 e il piccolissimo cromosoma 4.⁶⁵ Le femmine portano due cromosomi X, mentre i maschi portano un singolo cromosoma X e un cromosoma Y, ed entrambi portano due serie di secondi, terzi e quarti cromosomi autosomici. I cromosomi sessuali Y e X sono entrambi acrocentrici e possono essere diviso in due bracci dal centromero, di cui uno più grande e uno più piccolo. Al contrario, i cromosomi 2 e 3 sono metacentrici e con il centromero situato quasi al centro di due bracci, sinistro e destro, chiamati rispettivamente 2L, 2R, 3L e 3R. Anche il quarto cromosoma è acrocentrico, come i due cromosomi sessuali (Figura 12).⁶⁶

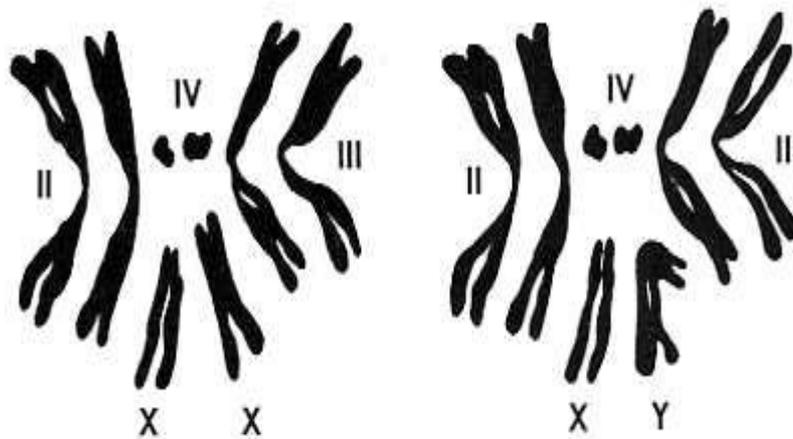


Figura 12. *Cromosomi di Drosophila melanogaster nella metafase della mitosi. Entrambi i sessi hanno tre coppie omologhe di autosomi. Inoltre, le femmine hanno due cromosomi sessuali X (a sinistra) e i maschi hanno un cromosoma sessuale X e un cromosoma sessuale Y (a destra).*⁶⁷

I cromosomi di *Drosophila* possono essere suddivisi funzionalmente e strutturalmente in regioni eterocromatiche ed eucromatiche. L'eterocromatina rappresenta le regioni scure di colorazione nel cariotipo. Le regioni dei cromosomi X, 2 e 3 adiacenti ai centromeri sono macchiate scuramente e vengono definite "eterocromatina pericentrica". I cromosomi Y e 4 sono scuri e completamente eterocromatici, sebbene il 4 abbia un piccolo braccio destro eucromatico.⁶⁶

Il cromosoma Y non è necessario per la vitalità di *Drosophila*; tuttavia, i maschi XO privi del cromosoma Y sono sterili. Inoltre, le *Drosophila* XXY sono femmine, indicando che il cromosoma Y non svolge alcun ruolo nella determinazione del sesso in *Drosophila*. Il sesso è determinato dall'equilibrio tra il cromosoma X e l'autosoma in *Drosophila*, poiché quando il rapporto $X:A=1$ la *Drosophila* sarà femmina, mentre se $X:A=0,5$ è maschio.⁶⁶

Di vitale importanza in *Drosophila* sono i cromosomi bilanciatori, un insieme di cromosomi specializzati che impediscono la ricombinazione attraverso una serie di inversioni del DNA.⁵⁶

Essi sono utilizzati per mantenere mutazioni deleterie in ceppi stabili, nonché per prevenire la ricombinazione e per seguire i cromosomi negli schemi di accoppiamento genetico. Questi cromosomi, quindi, impediscono la perdita di mutazioni letali o sterili da una popolazione e impediscono che più alleli sullo stesso cromosoma vengano separati dalla ricombinazione meiotica.⁶⁸

3.2.2 L'UTILIZZO GENETICO DI DROSOPHILA

Questi strumenti, e molte altre possibilità dal punto di vista scientifico, hanno consentito ai ricercatori di mantenere moltissime scorte di *Drosophila* con mutazioni multiple su singoli cromosomi in tante generazioni, un progresso che ha reso *Drosophila* il sistema genetico principale per essere studiato dal punto di vista genetico.⁵⁶ Seymour Benzer utilizzò *Drosophila* per studiare l'influenza dei geni sul comportamento, e il suo lavoro contribuì a comprendere quanto i geni contribuiscono a una funzione cerebrale più elevata, un progresso che è stato realizzato utilizzando esperimenti genetici semplici e complessi per osservare interessanti cambiamenti nel comportamento.⁶⁹

L'era moderna della ricerca sulla *Drosophila* è decollata quando l'embrione è stato analizzato in profondità per geni coinvolti nel suo sviluppo: la scoperta di base è stata che ci sono geni discontinui che regolano diversi aspetti dello sviluppo, e molti di questi geni si sono rivelati omologhi a quelli coinvolti nello sviluppo umano e nelle sue malattie. Questi geni sono stati conservati nel corso di milioni di anni di evoluzione e ciò potrebbe essere studiato facilmente e rapidamente a livello di *Drosophila*.⁷⁰

Attualmente, il sistema del trasposone MiMIC viene applicato per colpire tutti i geni nel genoma di *Drosophila*, fornendo mutazioni e una piattaforma per l'etichettatura delle proteine, il monitoraggio dell'espressione genica e altre funzioni attraverso un approccio di scambio di esoni. Questi, in combinazione con CRISPR/Cas9 e strategie di sovraespressione, consentono l'inattivazione, l'etichettatura e la sovraespressione di qualsiasi gene nel genoma entro poche settimane dall'inizio di un progetto: utilizzando questo approccio, qualsiasi gene o anche allele correlato ad una malattia umana può essere studiata in *Drosophila*.⁷¹

3.3 IL SISTEMA NERVOSO DI DROSOPHILA

Drosophila è un modello genetico e sperimentale ampiamente utilizzato anche a causa del suo sistema nervoso centrale (SNC), mediante il quale l'animale gestisce tutti i suoi comportamenti e riesce a vivere nell'ambiente circostante, ed è di importante interesse in ambito scientifico in quanto sono presenti delle vie evolutivamente conservate e può essere studiato anche per ciò che riguarda malattie dell'essere umano.⁵⁷

L'anatomia del sistema nervoso è relativamente complessa: il cervello presenta più lobi cerebrali anatomicamente distinti, che sono collegati tra loro da fasci nervosi. Il SNC può essere suddiviso in due regioni: la corteccia cellulare neuronale, dove risiedono tutti i corpi cellulari neuronali del SNC; e il neuropilo, a cui assoni e dendriti proiettano e formano circuiti neurali (Figura 13).⁷²

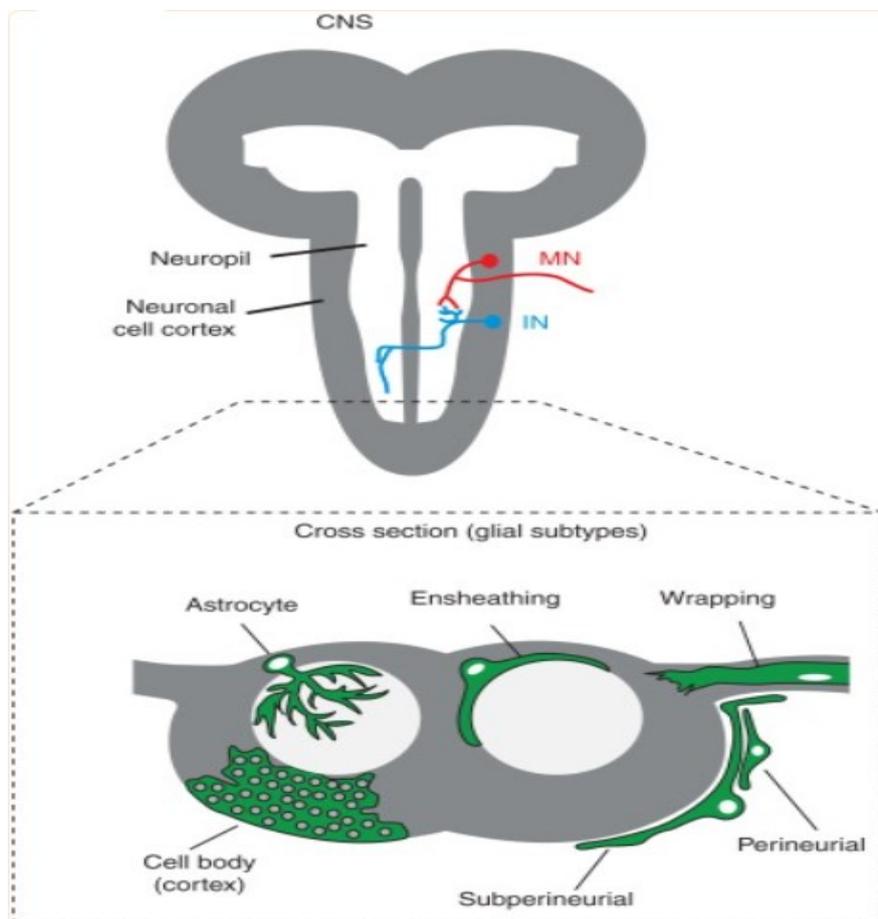


Figura 13. Panoramica del sistema nervoso centrale larvale della *Drosophila* (SNC). La corteccia cellulare neuronale (grigia) ospita tutti i corpi delle cellule neuronali e la maggior parte delle cellule gliali. I contatti sinaptici del SNC tra i neuroni si trovano all'interno del neuropilo (grigio chiaro). Gli interneuroni (IN) (blu) mantengono tutte le proiezioni all'interno del neuropilo: i motoneuroni (MN) (rosso) estendono i terminali degli assoni nel campo muscolare periferico. (In basso) Vista in sezione trasversale dei sottotipi gliali (verde). La disposizione morfologica nel cervello adulto è simile.⁷²

Il SNC di *Drosophila* è composto da un cervello bilateralmente simmetrico con due tipi di cellule, neuroni e cellule gliali, entrambi originati da progenitori neurali chiamati neuroglioblasti, ed è decisamente più semplice di quello dei vertebrati, con un modello di neuro-sviluppo che è conservato tra gli organismi. I neuroni si occupano principalmente della neurotrasmissione, mentre la glia sostiene i neuroni durante lo sviluppo e la vita adulta principalmente fornendo fattori trofici.⁷³

Si stima che il cervello di *Drosophila* adulta contenga 90.000 neuroni un milione di volte in meno rispetto al tipico cervello umano, ma con una complessità simile in alcune zone neuronali. Ad esempio, il sistema visivo della mosca contiene almeno 113 diverse classi di neuroni basate sulle macchie di Golgi, un numero simile agli occhi dei vertebrati. Ci sono alcune differenze tra il SNC di *Drosophila* e nei vertebrati: nel 1° il rapporto neurone/glia è 10:1, mentre nei vertebrati questo rapporto è 1:10. Questa differenza può essere dovuta al fatto che in *Drosophila* la glia avvolge fasci di neuroni piuttosto che singoli neuroni. Le mosche, inoltre, contengono diversi tipi di glia.⁷⁴

Lo strato più esterno di cellule associato alla superficie del SNC è composto da un sottoinsieme di cellule gliali chiamato “glia perineurale” (PG), che insieme ai macrofagi secernono una lamella ricca di carboidrati che copre il SNC e i nervi periferici, agendo da barriera chimica e fisica per il SNC. Lo strato di PG è discontinuo, con piccoli spazi vuoti, e al di sotto di questo c'è uno strato di cellule “gliali subperineurali” (SPG), con morfologia appiattita, coprono l'intera superficie del SNC e stabiliscono una barriera emato-encefalica (BBB). *Drosophila*, inoltre, possiede una serie di sottotipi gliali anche al di fuori del SNC che ricoprono, supportano e modulano lo sviluppo e la funzione dei neuroni sensoriali periferici e degli assoni e terminali dei motoneuroni.⁷²

Durante l'evoluzione, il rapporto tra neuroni e glia è cambiato a favore della glia, con numeri stimati che vanno dal 15% nella mosca, dal 50% nel topo al 90% nell'uomo, suggerendo un ruolo in espansione della glia proporzionale alla complessità del sistema nervoso in aumento.⁷⁵

Mosche e mammiferi utilizzano gli stessi neurotrasmettitori (GABA, glutammato, acetilcolina), condividono ammine come la dopamina e la serotonina e possiedono numerosi peptidi neuromodulatori. Al posto della noradrenalina, negli invertebrati troviamo l'octopamina, con attività simile. Come i mammiferi, *Drosophila* ha canali del sodio che propagano i potenziali d'azione e le stesse famiglie di canali del potassio e del calcio regolano il potenziale di membrana. In entrambi i sistemi, le informazioni passano tra i neuroni mediante sinapsi, che hanno un'architettura proteica comune.⁷⁴

3.3.1 IL COMPLESSO CENTRALE (CX)

A livello del SNC di *Drosophila*, riveste molta importanza una struttura definita complesso centrale (CX), di particolare interesse per la sua funzione legata alla visione. CX è costituito da quattro sottostrutture interconnesse: il ponte protocerebrale (PB), il corpo a “forma di ventaglio” (FB), il corpo ellissoide (EB) e i noduli accoppiati (NO); inoltre, i neuroni presenti a livello di CX sono stati suddivisi in due gruppi principali: neuroni a piccolo campo e neuroni a grande campo.⁷⁶

La funzione di CX è stata inizialmente correlata al controllo della locomozione, in particolare del controllo visuo-motorio. Tuttavia, un numero crescente di risultati indica che CX è coinvolto in molteplici forme di apprendimento e memoria, compresa la memoria del modello visivo, l'apprendimento del luogo visivo, l'apprendimento orientato, l'apprendimento olfattivo e la memoria, fungendo quindi da centro di elaborazione delle informazioni visive.⁷⁷

Il PB è una struttura a forma di manubrio che è stata trovata in tutti gli insetti esaminati fino ad oggi. PB media il targeting visivo e il controllo della lunghezza del passo nel camminare e la manualità locomotoria. FB è stato trovato coinvolto in comportamenti complessi tra cui la memoria del modello visivo, il condizionamento del corteggiamento e il sonno. EB è coinvolto in una serie di comportamenti visivamente guidati e nell'apprendimento. I NO giacciono ventrali all'FB e appena caudali all'EB, ma la loro funzione è meno compresa rispetto ad altre sottostrutture di CX.⁷⁷

Tutti i componenti di CX rispondono agli stimoli visivi. FB e NO rispondono agli stimoli visivi solo quando *Drosophila* è in volo, mentre PB ed EB rispondono già durante la quiescenza.

Questa discrepanza suggerisce ruoli differenziali delle sottostrutture CX: PB ed EB possono agire principalmente nell'elaborazione delle informazioni visive, mentre FB e NO possono contribuire al controllo visivo del volo, forse più a valle. I neuroni che innervano la visione, la memoria e la cognizione in *Drosophila* sono coinvolti in tutti i comportamenti di apprendimento visivi ma non si sa se questi neuroni funzionino attraverso meccanismi simili o distinti nell'apprendimento.⁷⁷

Un'altra regione importante del cervello di *Drosophila* è il protocerebrum, che contiene numerosi circuiti che mediano vari aspetti dei comportamenti. Al suo interno sono presenti i mushroom bodies, una struttura che media l'apprendimento olfattivo e i processi di memoria (Figura 14).⁷⁸

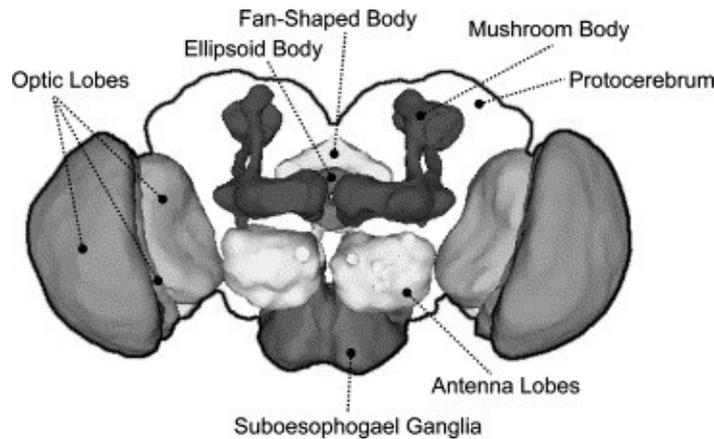


Figura 14. Rappresentazione del cervello adulto di *Drosophila*.⁷⁸

3.3.2 SVILUPPO DEL SNC

Drosophila è un organismo complesso che si sviluppa in un tempo molto breve. Fin dallo stato larvale, *Drosophila* è dotata di funzioni comportamentali che consente loro di raggiungere con successo i loro obiettivi principali: cercare cibo, mangiare, crescere, vivere. Questi comportamenti sono controllati da un SNC, costituito da un cervello e un cordone nervoso ventrale (VNC), che in questo stato contiene circa 15.000 cellule, di cui 1000 cellule gliali. Durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi, il SNC adulto viene costruito sul SNC embrionale, il quale sviluppo influenzato da stimoli ambientali e ormonali.⁷⁹

Lo sviluppo del SNC parte dalla fase di embrione, dove la mosca si sviluppa a partire da una singola cellula fecondata allo stadio larvale. Dopo la gastrulazione, processo in cui si formano l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma, i neuroblasti si staccano dall'ectoderma e producono cellule madri gangliari che a loro volta produrranno neuroni nella testa e nelle regioni ventrali, che diventeranno il cervello e il cordone nervoso ventrale (VNC) dell'embrione.⁷⁸ Il cervello è costituito da tre neuomeri cerebrali: protocerebrum, deutocerebrum e tritocerebrum. Il VNC, invece, contiene tre neuomeri subesofagei (detti anche S1–3), tre neuomeri toracici (T1–T3), sette neuomeri addominali completi (A1–7) e tre neuomeri terminali (A8–A10) con struttura ridotta (Figura 15).⁷⁹

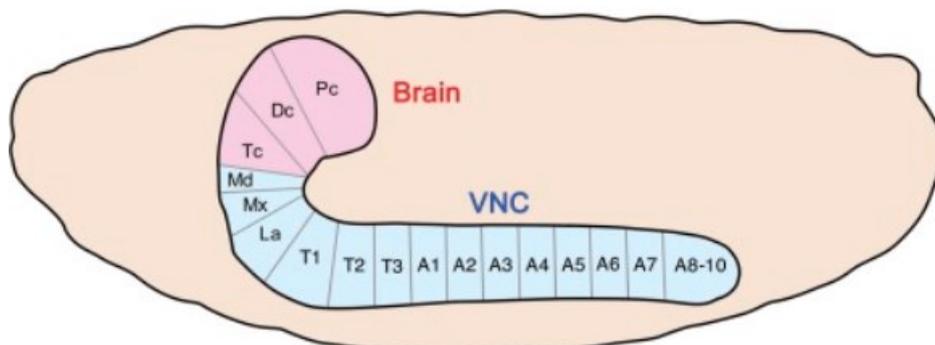


Figura 15. Schema di una vista sagittale del SNC embrionale con il cervello (rosso) e il VNC (blu).⁷⁹

Dopo lo stato embrionale si passa allo stato larvale. In questo stadio, il VNC è costituito da una rete di gangli bilateralmente simmetrici che corrispondono a determinati segmenti ciascuno contenente circa 400 neuroni. All'interno di ogni emi-segmento ci sono circa 36 motoneuroni identificati, che innervano 30 muscoli della parete corporea. Il neuropilo del VNC è ricoperto dalla glia, che forma una struttura simile alla BEE dei vertebrati. La trasmissione eccitatoria all'interno del VNC, e l'input ai motoneuroni, è mediata dall'acetilcolina e dai recettori nicotinici, mentre a livello della giunzione neuromuscolare (NMJ), il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio delle sinapsi dei motoneuroni, e il GABA agisce come neurotrasmettitore inibitorio.⁷⁸

3.3.3 IL SISTEMA VISIVO IN DROSOPHILA

Gli studi sul sistema visivo di *Drosophila* sono stati particolarmente importanti, perché lo sviluppo di questo sistema ha molto in comune con lo sviluppo del sistema visivo dei vertebrati, infatti si ritiene che gli occhi sia dei vertebrati che degli invertebrati abbiano un antenato evolutivo comune di circa 500 milioni di anni fa.⁸⁰ I meccanismi coinvolti nello sviluppo dell'occhio di *Drosophila* coinvolgono elaborate cascate di trasduzione del segnale che portano alla determinazione del destino cellulare, alla morte cellulare programmata e alla guida degli assoni. Nonostante ci siano architetture molto diverse la maggior parte degli eventi molecolari che porta alla formazione dell'occhio è simile anche a livello dei vertebrati e nell'occhio umano.⁷⁸

Il modo in cui le informazioni visive vengono elaborate e ricordate nel cervello centrale ha attirato un notevole interesse in *Drosophila*, che essendo un sistema modello geneticamente trattabile fornisce informazioni importanti sui substrati neuronali che controllano sia i comportamenti visivamente guidati, che l'apprendimento visivo o la memoria.⁷⁷

Il sistema visivo in *Drosophila* si sviluppa da cellule epiteliali indifferenziate a livello larvale mediante una serie di complesse interazioni cellula-cellula. L'occhio composto adulto della *Drosophila* è una matrice esagonale con circa 800 ommatidi per occhio, che possono vedere circa l'85% dello spazio visivo circostante. Ogni ommatidio è un insieme colonnare di 14 cellule: 8 cellule fotorecetrici, 4 cellule coniche e 2 cellule del pigmento primario. Sono presenti altre cellule di supporto, come le cellule del pigmento secondario e le cellule delle setole. Le 8 cellule fotorecetrici (chiamate cellule R, da 1 a 8) sono i neuroni fotosensibili, e possono essere raggruppate in 3 tipi in base alla loro sensibilità spettrale.⁷⁸

La retina di *Drosophila* è necessaria non solo per rilevare l'intensità della luce, ma anche per la visione di oggetti in movimento e del colore. Gli assoni dei fotorecettori retinici proiettano ai lobi ottici per un'ulteriore elaborazione: questi in *Drosophila* sono ben organizzati e comprendono quattro strutture principali, ovvero lamina, midollo, lobula e placca lobulare (Figura 16).⁷⁷

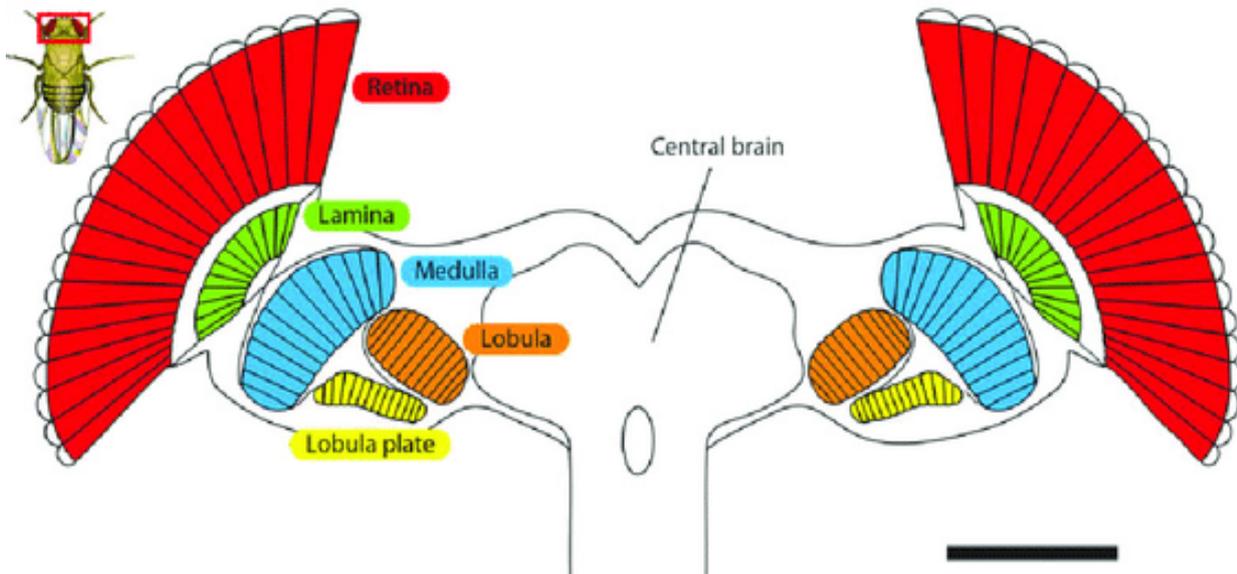


Figura 16. Sezione orizzontale del cervello e del sistema visivo della mosca. Il lobo ottico è costituito da quattro neuropili organizzati retinotopicamente: la lamina, il midollo, la lobula e la piastra della lobula.⁸¹

Il rilevamento del movimento si basa su cellule da R1 a R6. A valle di R1 a R6, esistono due percorsi paralleli separatamente responsabili dell'elaborazione dei bordi chiari e dei bordi scuri in movimento. I neuroni T4 (o T5) sono classificati in quattro sottogruppi, ognuno dei quali è responsabile del rilevamento di una direzione cardinale: front-to-back, back-to-front, upward e downward. I neuroni T4 e T5 proiettano quindi alla piastra lobulare cellule tangenziali che sono localizzate in quattro strati di piastra lobulare, rendendo ogni strato specificamente sensibile a una sola direzione di movimento. In *Drosophila*, la visione dei colori è realizzata attraverso fotorecettori interni R7 e R8 che esprimono rodopsine con diversa sensibilità spettrale. I fotorecettori cromatici R7/8 proiettano direttamente al midollo e mirano ad almeno cinque gruppi di neuroni del midollo. Tutti questi neuroni inviano informazioni cromatiche più in profondità a un centro superiore della lobula.⁷⁷

I fotorecettori sono divisi in due parti: il corpo cellulare e il raddomero. La fotorecezione e la trasduzione del segnale avvengono nei raddomeri, che sono costituiti da pile di microvilli, lunghi 1,2–1,5 µm e privi di organelli interni. La trasduzione visiva nell'occhio composto di *Drosophila* avviene mediante un percorso che accoppia la rodopsina alla fosfolipasi C e l'apertura dei canali del potenziale recettore transitorio. Questa cascata differisce dalla fototrasduzione nei bastoncelli e nei coni dei

mammiferi, ma è simile alla segnalazione nelle cellule gangliari retiniche. I fotorecettori in *Drosophila* esprimono diverse isoforme di rodopsina: da R1 a R6 viene espressa rodopsina1, che assorbe la luce blu, R7 e R8 esprimono una combinazione di rodopsina 3 o 4 tale da poter assorbire la luce UV e di rodopsina 5 o 6 per assorbire rispettivamente la luce blu e verde.⁸²

3.4 TOOLS GENETICI E OPTOGENETICI IN DROSOPHILA

Uno degli aspetti più interessanti in *Drosophila* come sistema modello è la capacità di eseguire screening con modificazioni ad alto rendimento. In questo processo, in *Drosophila* viene eseguita una mutagenesi casuale su larga scala, selezionando migliaia di individui per una modifica del fenotipo desiderato, e il gene mutante viene successivamente identificato utilizzando tecniche di biologia molecolare. Le mutazioni possono essere eseguite irradiando le mosche per produrre delezioni, trattandole con un mutageno chimico per generare mutanti puntiformi o introducendo casualmente elementi transgenici nei cromosomi. Attualmente, il terzo metodo è il più comune, poiché consente un'identificazione rapida ed efficiente del gene colpito.⁷⁸ Nuove più recenti tecniche genetiche permettono ora di inserire il transgene nel punto di genoma prefissato, bypassando possibili alterazioni fenotipiche indotte non dal transgene stesso, ma dal suo punto d'inserzione nel genoma.

La neurobiologia di *Drosophila* comprende molti campi di interesse, con numerosi neuroni e geni sono coinvolti in questi processi. Sono disponibili essenzialmente due strategie: un approccio neurone-centrico e uno gene-centrico. Il 1° approccio si basa su tecniche che etichettano sottoinsiemi di neuroni, consentendo la rimozione di neuroni specifici, l'alterazione della funzione neuronale o l'aumento dell'attività neuronale, seguita dall'analisi di un output, ad esempio di un comportamento specifico. La capacità di manipolare molte popolazioni neuronali diverse e specifiche è fornita da migliaia di singoli ceppi che esprimono attivatori trascrizionali come GAL4, LexA e QF in popolazioni neuronali selettive. Il 2° approccio si basa su metodi genetici diretti o inversi. Gli approcci genetici inversi sono progettati per influenzare un gene di interesse e includono la mutagenesi del trasposone, la mutagenesi della delezione, l'RNAi e il targeting genico. Sia gli approcci genetici diretti che quelli inversi consentono la valutazione dei fenotipi associati a queste mutazioni per fornire una migliore comprensione del ruolo dei geni e delle loro proteine corrispondenti nel sistema nervoso in vivo.⁷⁴

Sono disponibili diverse tecniche genetiche per etichettare i neuroni nel cervello di *Drosophila*. Gli elementi regolatori che dirigono l'espressione genica in un momento e in un luogo specifici possono essere posizionati a monte di un marcatore desiderato. Tuttavia, i metodi preferiti impiegano sistemi di espressione binaria in cui uno stock di *Drosophila* che esprime un trans-attivatore o driver (ad es.

GAL4) viene incrociato con uno stock che porta un elemento responder per produrre una progenie in cui un determinato gene viene espresso nel momento e nel luogo desiderati.⁷⁴

3.4.1 TRANSGENESI

Nel 1982, Rublin & Spradling hanno sviluppato un metodo robusto per generare mosche transgeniche utilizzando elementi trasponibili di elementi P. Gli elementi P e i relativi elementi trasponibili mediano l'integrazione stabile delle inserzioni di DNA nei cromosomi in posizioni casuali.⁸³ Sebbene il principio di base della creazione di una *Drosophila* transgenica con questo metodo sia rimasto lo stesso dalla sua invenzione, la natura del vettore dell'elemento trasponibile è cambiata radicalmente. Ora sono disponibili molte variazioni per controllare ed esaminare i modelli di espressione di geni sia endogeni che transgenici. In quest'ambito riveste molta importanza il sistema binario GAL4/UAS, sviluppato da Brand e Perrimon (Figura 17). Questo metodo transgenico consente un controllo spaziale e temporale sull'espressione di un dato transgene, utilizzando il fattore di trascrizione del lievito GAL4: e le sue sequenze uniche del sito di legame (UAS), non espresse negli organismi superiori. In sostanza, si prepara un costrutto plasmidico di DNA che contiene la regione del promotore per il gene di interesse che guida l'espressione del gene GAL4. Questo costrutto viene poi utilizzato per creare una *Drosophila* transgenica mediante procedure di iniezione di embrioni. Si prepara quindi un 2° costrutto di DNA che contiene i siti di legame del DNA per GAL4, guidando l'espressione di un gene reporter o di un dato transgene. Nella prima linea, GAL4 viene prodotto solo nel tessuto di interesse, in base al suo promotore. All'interno della seconda linea, ogni cellula ha l'UAS ed è competente per esprimere il gene reporter, ma il locus è silenzioso a causa della mancanza di GAL4 endogeno nel volo: questi ceppi GAL4 e UAS vengono quindi accoppiati tra loro e la loro progenie viene esaminata.⁸⁴

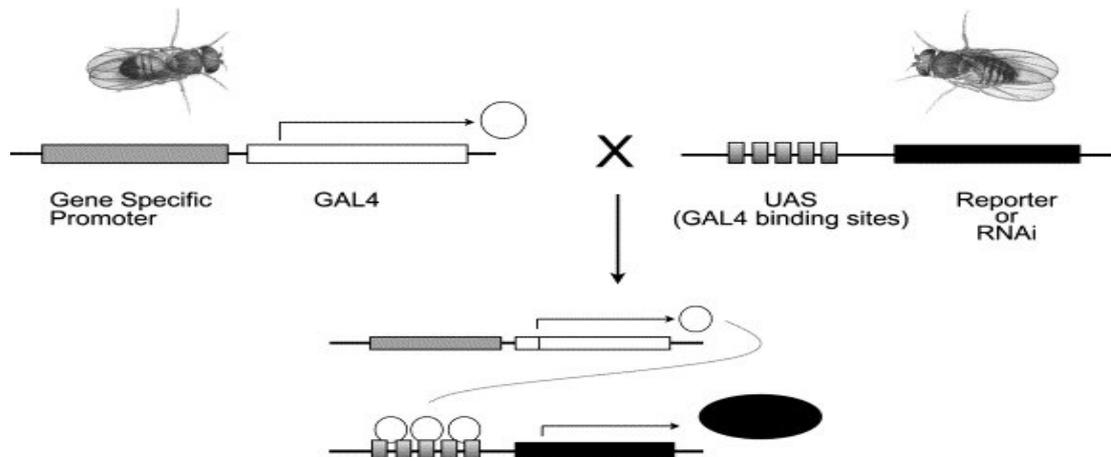


Figura 17. Schema del sistema di espressione GAL4/UAS. Questo sistema può consentire un'espressione transgene spaziale e temporale molto precisa. Viene creato un ceppo di mosca che esprime il fattore di trascrizione del lievito GAL4 sotto il controllo di elementi potenziatori per un gene specifico. Viene prodotto un secondo ceppo di mosca che ha un transgene responder (ad esempio gene reporter, elemento RNAi). Quando questi due ceppi vengono incrociati tra loro, la progenie esprime il gene responder esclusivamente nei tessuti definiti dal promotore gene specifico.⁷⁸

Nelle mosche contenenti entrambi i costrutti, il gene del transgene è espresso solo in quei tessuti che esprimono GAL4, come determinato dal promotore specifico. Uno dei principali vantaggi di questa tecnica è che una volta prodotto il costrutto UAS-reporter, questo può essere utilizzato per saggiare gli effetti dell'espressione di un numero qualsiasi di diversi geni responder con un controllo squisito sull'espressione spaziale e temporale nel circuito definito dal promotore semplicemente incrociando un ceppo contenente un elemento UAS-responder. Le linee di elementi del responder possono essere utilizzate per esprimere in modo errato un gene, sovraesprimere un gene e inattivare o sottoregolare geni specifici. Sono state prodotte centinaia di linee di potenziatore GAL4 e risponditore UAS per molti geni della *Drosophila*, alcune delle quali sono disponibili presso centri di stock pubblici.⁷⁸

Nel processo di scoperta del farmaco, si potrebbe immaginare di utilizzare il sistema GAL4/UAS per sovraesprimere o eliminare la funzione di un dato recettore del neurotrasmettitore all'interno di specifici circuiti neurali del cervello di *Drosophila* in modo da creare una disfunzione che sia parallela a un processo osservato in una particolare malattia umana. Questo cambiamento dovrebbe produrre un fenotipo osservabile: ad esempio, si pensa che l'aumento della funzione dopaminergica sia coinvolto in alcuni disturbi neuropsichiatrici come la psicosi o l'ADHD. Un potenziale modello per studiare questa ipotesi potrebbe essere quello di sovraesprimere il recettore di *Drosophila* DA-D1, DopR2, utilizzando il sistema di espressione GAL4/UAS all'interno delle regioni del cervello di mosca coinvolte in comportamenti di ordine superiore, come il complesso centrale.⁷⁸

3.4.2 MANIPOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ NEURONALE

Come nei vertebrati, alcune aree del cervello sono specializzate per il controllo di specifici programmi comportamentali, è quindi necessaria una strategia di ricerca per identificare i neuroni specifici che producono determinati comportamenti. I sistemi binari a base di GAL4 possono essere utilizzati per manipolare l'attività neurale e determinarne successivamente l'effetto sul comportamento: ad esempio, le linee GAL4 sono state utilizzate per indirizzare l'espressione di tossine o geni che avviano la morte cellulare programmata in particolari popolazioni cellulari nel SN embrionale, per dimostrare che queste cellule fungono da guida per le decisioni di guida degli assoni di altri neuroni. L'uccisione di una cellula, però, è una manipolazione estrema, che può avere conseguenze collaterali indesiderabili.⁷⁴

Un'altra strategia che può essere attuata è quella del silenziamento di un neurone, impedendo il rilascio del neurotrasmettitore o bloccando i cambiamenti nel potenziale di membrana, in modo da determinarne la funzione più correttamente. I neuroni di *Drosophila* rilasciano neurotrasmettitori come glutammato, GABA e acetilcolina dalle vescicole sinaptiche in risposta all'afflusso di calcio localizzato attraverso i canali del calcio attivati dal voltaggio. Mentre le vescicole sinaptiche

condividono gran parte del meccanismo di rilascio con le vescicole in altri tipi cellulari, alcune proteine come la sinaptobrevina neurale (nSyb) sono specifiche dei neuroni e arricchite in vescicole sinaptiche. L'interruzione di queste proteine può silenziare i neuroni impedendo il rilascio di vescicole contenenti neurotrasmettitori. L'espressione della catena leggera della tossina tetanica (UAS-TNT o Tet o TeTxLc) scinde nSyb e blocca il rilascio delle vescicole.⁷⁴

Oltre al silenziamento, i neuroni possono anche essere resi più attivi aumentando la conduttanza del sodio o del calcio o riducendo la conduttanza del potassio. Il canale cationico attivato dalla temperatura UAS-dTrpA1 è stato un potente reagente per attivare in modo acuto l'attività neurale ed è stato utilizzato per identificare i neuroni coinvolti nel sonno e nel comportamento di corteggiamento. Una valutazione dell'efficacia dell'espressione continua di UAS-dTrpA1 mostra che una maggiore eccitazione può essere mantenuta in alcune cellule. L'attivazione acuta in risposta a un moderato aumento della temperatura e la depolarizzazione sostenuta hanno reso UAS-dTrpA1 uno strumento preferito in molti laboratori.⁷⁴

3.4.3 OPTOGENETICA

Con il termine optogenetica viene descritto un insieme di tecniche che, nel loro complesso, consentono di rendere una qualsiasi cellula nervosa responsiva a dei determinati stimoli luminosi. Il concetto alla base è quello di attivare o inibire un neurone mediante l'utilizzo della luce, un neurone che normalmente non è in grado di rispondere a tale stimolo (nel caso in cui questo venisse attivato). Si tratta di un approccio che integra metodi ottici (opto-) e genetici (genetica) in modo tale da controllare l'attività di circuiti neuronali. L'optogenetica, utilizzando tecniche di manipolazione genetica, consente di introdurre in una popolazione selezionata di neuroni un transgene che codifica per un canale ionico fotosensibile.⁸⁵

I vantaggi dell'optogenetica possono essere sfruttati al meglio in animali come *Drosophila*, geneticamente trattabili i cui sistemi nervosi sono, da un lato, abbastanza piccoli in termini di numero di cellule e in una certa misura organizzati in modo stereotipato, in modo tale che neuroni distinti e identificabili possano essere presi di mira in modo riproducibile. D'altra parte, i circuiti neuronali e il repertorio comportamentale dovrebbero essere abbastanza complessi da consentire di affrontare domande interessanti. Tuttavia, l'applicazione di strumenti optogenetici per depolarizzare o iperpolarizzare i neuroni attraverso correnti ioniche indotte dalla luce è stata difficile da valutare nelle *Drosophila* adulte. Solo di recente sono state introdotte diverse varianti di Canalrodopsina-2 (ChR2) che forniscono sufficiente sensibilità alla luce, espressione e stabilità per depolarizzare efficacemente i neuroni centrali del cervello nella *Drosophila* adulta.⁸⁶

ChR2 è un canale ionico con azione depolarizzante che si apre in risposta alla luce blu, permettendo il passaggio di cationi come Na^+ . Un qualsiasi neurone in cui venga introdotto il transgene per ChR2 si attiverà ogni volta che verrà esposto alla luce blu, quindi l'espressione in un neurone di una rodopsina come ChR2 consente di trasformare uno stimolo luminoso in un segnale elettrico. Mentre ChR2 determina la depolarizzazione della membrana plasmatica neuronale, altre rodopsine, come l'alorodopsina che codifica per un canale del Cl^- , sono invece iperpolarizzanti con azione inibitoria.⁸⁵ Esprimendo ChR2 in un sottoinsieme di neuroni, si possono studiare i comportamenti specifici controllati da quei neuroni impostando la luce con una specifica lunghezza d'onda, per aprire la canalrodopsina e attivare successivamente i nervi. Sono state sviluppate delle tecniche che utilizzano il sistema GAL4/UAS per esprimere una canalrodopsina in sottoinsiemi di neuroni in *Drosophila* larvale o adulta. Emettendo una luce rossa intensa (625 nm) o blu (460 nm) sugli adulti (o sulle larve a seconda dei casi), le canalrodopsine si aprono e i neuroni che esprimono queste proteine vengono depolarizzati e attivati, determinando un comportamento specifico (Figura 18).⁸⁷

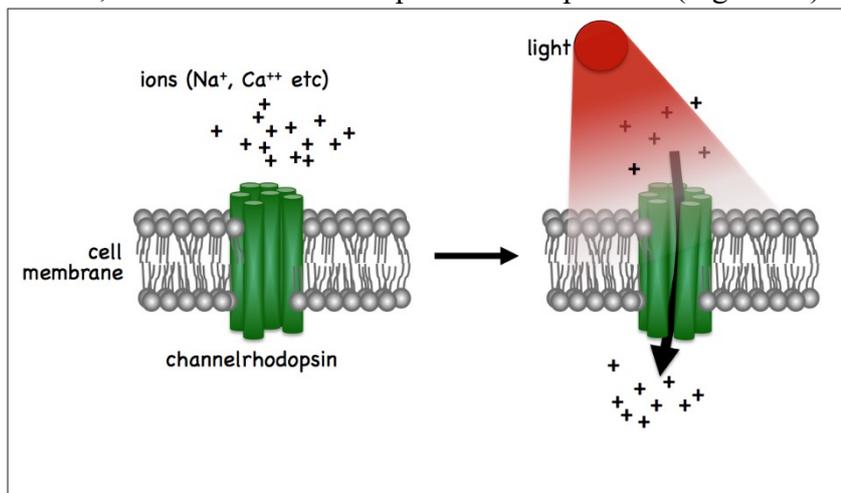


Figura 18. Apertura della canalrodopsina indotta dalla luce che permette l'ingresso del flusso di ioni nel neurone, provocando un'attivazione neuronale.⁸⁷

Poiché l'erogazione della luce può essere controllata temporalmente, questi strumenti consentono di immettere o interrompere direttamente le informazioni all'interno dei neuroni e di indagare su ciò che i neuroni stanno effettivamente facendo quando sono attivi nelle loro reti. UAS-ChR2 è stato utilizzato per studiare l'apprendimento e il dolore delle larve, le risposte di fuga degli adulti e l'evitamento della CO₂. Gran parte dell'uso attuale di reagenti optogenetici in *Drosophila* è stato fatto negli stadi embrionali e larvali, dove la luce penetra meglio. Il tessuto cerebrale adulto può essere reso più accessibile mediante rimozione parziale della cuticola, ma ciò limita la gamma di comportamenti che possono essere studiati. Inoltre, alcuni comportamenti possono essere influenzati dallo stimolo luminoso; questa confusione può essere ridotta utilizzando reagenti attivati dalla luce spostata verso il rosso, che è fuori dal raggio visivo di *Drosophila*.⁷⁴

3.5 DROSOPHILA, MODELLO COMPORTAMENTALE

Il fatto che molti geni trovati nelle mosche abbiano omologhi strutturali o funzionali nei vertebrati, compresi gli esseri umani, significa che le scoperte genetiche nel moscerino della frutta possono contribuire alla nostra comprensione generale dei processi evolutivamente conservati per lo sviluppo e fisiologici. *Drosophila*, tuttavia, è molto più di un semplice strumento di ricerca genetica, perché rappresenta un modello genetico eccezionale per lo studio di comportamenti semplici e complessi.

Drosophila mostra molti modelli di comportamento complessi: ad esempio, il maschio mostra un comportamento di corteggiamento pieno di stimoli sensoriali e che richiede alla femmina di ascoltare il suo canto, annusare i suoi odori e valutare visivamente la sua statura. Le mosche mostrano anche comportamenti ritmici, compresi i cicli di attività-riposo che sono simili ai cicli sonno-veglia nei mammiferi. Inoltre, presentano diversi comportamenti legati all'alimentazione: alcune sono attive quando si nutrono e si muovono per campionare cibo da varie fonti, mentre altre si nutrono solo localmente. Le mosche possono imparare e ricordare ciò che è stato insegnato loro per una percentuale significativa della loro vita, mostrando tutte le caratteristiche di base dell'apprendimento e della memoria dei mammiferi. I maschi difendono il loro approvvigionamento alimentare mostrando un comportamento aggressivo, e le femmine mostrano una semplice forma di comportamento materno scegliendo un sito appropriato per deporre le uova.⁸⁸

L'analisi del comportamento in *Drosophila* è sicuramente molto complesso. La neuro-modulazione può migliorare la capacità computazionale di alcuni circuiti neurali per consentire alla mosca di mostrare determinati comportamenti in risposta a stati interni specifici o a stimoli esterni. La plasticità comportamentale è attribuita all'azione di ammine biogeniche, tra cui dopamina, serotonina, istamina e octopamina, che esercitano effetti neuromodulatori su funzioni come l'apprendimento olfattivo, l'aggressività, l'alimentazione e la deposizione delle uova. L'elaborazione visiva è necessaria per molti di questi comportamenti: ad esempio, per nutrirsi, ci sarebbe il bisogno di identificare visivamente e quindi avvicinarsi e valutarne il valore nutrizionale.

Durante la locomozione, la visione del movimento viene utilizzata per molte azioni tra cui stabilizzare lo sguardo visivo, correggere le perturbazioni esterne, evitare ostacoli o minacce e avvicinarsi agli oggetti desiderati. Durante il volo, un animale deve valutare la scena visiva per determinare rapidamente se avvicinarsi o evitare un oggetto che potrebbe essere un potenziale compagno o predatore mortale, e questa determinazione potrebbe cambiare con il contesto.⁸⁹

Per dare una determinata risposta comportamentale, occorre discriminare gli stimoli sensoriali principali rispetto al rumore di fondo e bisogna assegnare un valore agli stimoli: tali valutazioni dipendono dal contesto in cui è situato l'animale, e dipende anche dalla presenza o meno di altri esseri simili. Uno studio eseguito da Ramdya ha scoperto un peculiare "effetto gregge" nelle mosche esposte all'anidride carbonica (CO₂), con una conseguente risposta di fuga. È stato scoperto che le mosche solitarie evitano solo debolmente la CO₂ e che solo quando le mosche sono in gruppo viene evitata fortemente la CO₂. È stato utilizzato questo modello comportamentale della CO₂ insieme a varie tecniche per sezionare i meccanismi neuronali che consentono a uno stimolo sensoriale di suscitare risultati comportamentali in modo dipendente dalla densità di popolazione animale.

È stato utilizzato un test comportamentale con il quale si potevano osservare individui o gruppi di mosche che camminavano liberamente con aria da un lato e CO₂ dall'altro lato di un'arena, con due scelte possibili. Le mosche sono state lasciate nell'arena ed è stata misurata la frazione di tempo trascorsa sul lato dell'arena con l'aria rispetto al lato con CO₂. Le mosche testate individualmente hanno trascorso pochissimo tempo evitando la CO₂ mentre, in gruppo, con l'aumentare del numero di individui aumentava anche il tempo trascorso evitando l'odore di CO₂.

Sono stati poi esaminati più da vicino i modelli di locomozione delle singole mosche ed è stato osservato che la maggior parte delle mosche ha iniziato ad allontanarsi da CO₂ dopo essere entrata in contatto con un'altra mosca, un processo definito "Encounter Response", in aumento proporzionale al numero di mosche presenti.⁹⁰

3.5.1 APPRENDIMENTO E MEMORIA

Alla base di ogni comportamento c'è la certezza che *Drosophila* può imparare e ricordare, e che ogni risposta comportamentale scaturita da processi di memoria o apprendimento abbia una base di tipo genetico. La capacità di apprendimento e di memoria di *Drosophila* è stata accertata utilizzando una procedura di apprendimento definita "olfactory-based shock-avoidance learning", un modello in cui uno shock è abbinato a uno dei due stimoli olfattivi offerti all'animale, in modo che l'animale impari ad evitare lo stimolo abbinato allo shock in un successivo test di scelta che non include uno shock.

Questa procedura è stata utilizzata per isolare *dnc*, il primo mutante a singolo gene per l'apprendimento associativo. I mutanti *dnc* hanno livelli anormalmente elevati di cAMP perché mancano di fosfodiesterasi, che degrada la cAMP. È importante sottolineare che ci sono prove che la cascata del cAMP modula la plasticità strutturale e funzionale sinaptica, che si pensa, in parte, sia alla base dell'apprendimento e della memoria. *dnc* è un grande e complesso locus che ha diversi effetti pleiotropici durante lo sviluppo e l'età adulta, è ampiamente espresso nel sistema nervoso e alcuni

alleli mutanti di *dnc* causano alterazioni nella struttura dei mushroom bodies, necessari per l'apprendimento olfattivo basato sull'evitamento degli shock e sulla formazione della memoria nella *Drosophila*. L'ablazione chimica dei mushroom bodies abolisce l'apprendimento olfattivo appena descritto e i mutanti con anomalie strutturali nei corpi dei funghi mostrano difetti di apprendimento olfattivo.

Infine, l'interruzione della neurotrasmissione nei mushroom bodies in *Drosophila* blocca il recupero, ma non l'acquisizione, della memoria. A partire dalla scoperta di *dnc*, gli studi sull'apprendimento e la memoria in *Drosophila* hanno scoperto l'importanza della via di segnalazione cAMP per l'apprendimento e la memoria di evitamento degli shock basati sull'olfatto.⁸⁸

3.6 LE RISPOSTE OPTO-MOTORIE

Un controllo comportamentale appropriato nell'ambiente circostante è importante per la sopravvivenza della maggior parte degli organismi. In condizioni di laboratorio, si può progettare uno stimolo sensoriale semplice e ideale per indagare i meccanismi neurali dell'elaborazione delle informazioni sensoriali. Tuttavia, negli habitat nativi reali, gli animali raramente ricevono stimoli semplici perché gli input sensoriali cambiano spazio-temporalmente, e tali cambiamenti spesso appaiono contemporaneamente, rendendo il segnale rumoroso, occorre quindi rispondere anche a stimoli vaghi e spesso confusionari, che si sovrappongono.⁹¹

La risposta optomotoria (OMR) è un'importante reazione comportamentale ad uno stimolo sensoriale; è osservato nella maggior parte degli animali dipendenti dalla vista, dai vertebrati agli invertebrati. L'OMR è una reazione compensativa al movimento ad ampio campo in modo tale da stabilizzare l'immagine retinica, fondamentale per il controllo visivo in *Drosophila* durante il volo, la camminata o la fuga. Le informazioni sul movimento elaborate retinotopicamente convergono in un insieme di neuroni sensibili al movimento ad ampio campo chiamati cellule tangenziali a placche lobulari (LPTC), che coinvolgono tre cellule del sistema orizzontale (HS) che rispondono agli stimoli di movimento orizzontale ad ampio campo.

Durante la stimolazione del movimento a direzione preferita, i potenziali di membrana cellulare HS sono depolarizzati, mentre sono iperpolarizzati durante la direzione anti-preferita o nulla. Studi precedenti hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule HS induce l'OMR e hanno inoltre riportato che i difetti nelle LPTC riducono l'OMR ambulante, suggerendo una forte associazione tra l'attività delle cellule HS e l'OMR.⁹¹

Un animale in movimento che osserva un obiettivo cerca di seguirlo con movimenti degli occhi, della testa o del corpo. La maggior parte degli insetti non ha una visione stereoscopica per misurare la distanza degli oggetti circostanti, è quindi necessario sfruttare i segnali visivi ottenuti dal proprio movimento, definendo flusso ottico qualsiasi movimento della testa dell'animale che determina uno spostamento dell'immagine sulla retina. Solo durante le traslazioni gli oggetti vicini viaggeranno attraverso la retina più velocemente rispetto a quelli lontani, fornendo informazioni all'insetto riguardanti la distanza, mentre ciò non accade durante le rotazioni. Per stimare la distanza degli oggetti, *Drosophila* separa i movimenti di traslazione dalle rotazioni e vira rapidamente per ridurre il tempo di rotazione, intervallando movimenti traslazionali con rotazioni brusche del corpo chiamate saccadi, già citate precedentemente a livello dell'uomo, ovvero dei movimento rapidi di entrambi gli occhi tra due o più fasi di fissazione.⁹²

Gli esseri umani generano movimenti del corpo, della testa e/o degli occhi per fissare un oggetto visivo in movimento sulla fovea frontale, mentre *Drosophila* muove tutto il corpo in volo per adempiere agli stessi scopi, essendo un animale afoveato e che, soprattutto, muove sia la testa che gli occhi insieme durante una saccade. Nella visione umana esistono diversi tipi di saccadi: le saccadi riflesse sono attivate dalla comparsa o dalla scomparsa di uno stimolo esterno, mentre le saccadi a scansione sono attivate in modo endogeno per l'esplorazione dell'ambiente visivo. In *Drosophila*, tecniche computazionali hanno rivelato che la maggioranza di saccadi è dovuta a cause sensoriali esterne, e sono quindi di natura riflessiva, evocate dall'espansione visiva di un oggetto o di una superficie in avvicinamento. Anche le mosche tetherizzate generano saccadi in assenza di qualsiasi movimento visivo, suggerendo che anche i processi endogeni possono evocare saccadi.⁹³

Durante la saccade, la velocità di rotazione degli occhi è superiore a 100°/s, rendendo impossibile il controllo a feedback negativo della precisione del movimento oculare. L'ampiezza della saccade e la sua direzione sono pertanto pre-programmate: il SNC sa già prima quale dovrà essere il movimento oculare coniugato per analizzare dettagliatamente un oggetto del campo visivo di cui non ha ancora una chiara percezione. Deve esistere pertanto un processo cognitivo in grado di selezionare di volta in volta un oggetto tra gli infiniti del campo visivo che possa emergere, venendo selezionato ed elaborato coscientemente.⁹³

3.6.1 ELABORAZIONE DEI SEGNALI VISIVI IN DROSOPHILA

La risposta percettiva a uno stimolo sensoriale dipende dallo stato comportamentale dell'animale, ed è evidente se si confrontano le risposte tra animali svegli, addormentati o anestetizzati. Le proprietà di risposta dei neuroni sensoriali dipendono dallo stato locomotore dell'animale, tuttavia, non è chiaro a quale livello del sistema nervoso si verifichi l'integrazione dell'input sensoriale e dello stato dell'animale e secondo quali regole.

Drosophila è nota per il suo volo acrobatico, un comportamento di volo che ha conseguenze importanti per la visione, perché le curve veloci possono portare alla sfocatura del movimento e quindi compromettere la visione dei dettagli spaziali. Questi effetti negativi sulla vista possono, in linea di principio, essere parzialmente compensati dai movimenti oculari, tuttavia gli occhi sono fissati alla capsula della testa e sono possibili solo piccoli movimenti oculari. Pertanto, i movimenti oculari compensatori efficaci possono essere effettuati solo ruotando la testa. *Drosophila* può girare la testa rispetto al torace attorno a tutti e tre gli assi del corpo ma con ampiezze diverse. Di conseguenza, i movimenti del torace durante il volo sono compensati da contro-movimenti della testa rispetto al torace. Questi movimenti della testa sono mediati dal sistema motorio del collo, che consiste di 21 paia di muscoli, ognuno dei quali innervato da un singolo motoneurone. I tre muscoli orizzontali obliqui, OH3-5, sono forniti dal nervo cervicale ventrale, che comprende gli assoni di tre motoneuroni identici, VCNM1-3.⁹⁴

Sia che voli o cammini, *Drosophila* si orienta facilmente verso oggetti in movimento di grandi dimensioni, come barre verticali allungate: questo comportamento è mediato dalle interazioni tra la visione del movimento e il rilevamento delle caratteristiche indipendenti dal movimento. *Drosophila* è in grado di eseguire alcuni comportamenti diretti nei confronti degli oggetti quando i rilevatori di movimento colonnare selettivi direzionali (T4 e T5) che forniscono il terzo ganglio ottico (piastra lobulare) vengono silenziati: questa scoperta supporta l'esistenza di circuiti di rilevamento di oggetti che agiscono indipendentemente dal percorso canonico di visione del movimento. Mentre molte delle cellule, dei circuiti e dei calcoli necessari per l'elaborazione del movimento da parte di T4 e T5 e della piastra lobulare a valle stanno diventando sempre più chiari, il ruolo circuitale e funzionale della lobula è poco compreso in *Drosophila*. La lobula contiene più di 22 tipi di neuroni di proiezione visiva (VPN), compresi i neuroni colonnari della lobula (LC) che proiettano verso il protocerebro ventrolaterale (VLP) e formano domini di output ricchi di sinapsi chiamati glomeruli ottici.

I neuroni a valle dei neuroni LC che interconnettono più glomeruli ottici nel cervello centrale rispondono a piccoli oggetti, aumentando la possibilità che le LC selezionate possano essere

sintonizzate su piccoli oggetti. I metodi optofisiologici ed elettrofisiologici hanno dimostrato che diversi neuroni LC sono ampiamente sensibili alle caratteristiche visive, come bordi o barre.⁹⁵

Un rivelatore di oggetti specializzato in *Drosophila* è il neurone colonnare della lobula LC11: osservando la dinamica del calcio con la microscopia a eccitazione a due fotoni, si osserva che LC11 risponde al movimento omnidirezionale di un piccolo oggetto più scuro dello sfondo, con risposte minime o nulle a sfarfallio statico, barre allungate verticalmente o grigliati panoramici. I dendriti LC11 innervano più strati della lobula e ogni dendrite si estende su abbastanza colonne per campionare 75° dello spazio visivo, ma l'area che evoca le risposte del calcio è larga solo 20°. I dendriti dei vicini LC11 codificano retinotopicamente il movimento dell'oggetto, ma i terminali assonali si fondono in una struttura glomerulare nel cervello centrale dove si perde la retinotopia. Il blocco delle correnti ioniche inibitorie abolisce la sensibilità dei piccoli oggetti e facilita le risposte a barre e griglie allungate. Questi risultati rivelano il rilevamento del movimento degli oggetti ad alta acuità nel lobo ottico di *Drosophila*.⁹⁵

3.6.2 STUDI DI TETHERING

La maggior parte degli animali sposta lo sguardo con una strategia di "fissazioni e saccadi", in cui la fase di fissazione stabilizza il movimento di fondo. Un prerequisito logico per il rilevamento e il tracciamento robusti di oggetti in primo piano in movimento, quindi, è quello di sopprimere la percezione del movimento sullo sfondo, ovvero il rumore. Questa capacità visiva, in *Drosophila*, può essere esaminata mediante studi di tethering, ovvero esperimenti in cui viene immobilizzata, in condizioni che possono variare sia nella metodica che nell'ambiente, sottoposta a determinati stimoli visivi estrapolarne informazioni sul funzionamento del sistema visivo e cerebrale (Figura 19).⁹⁶

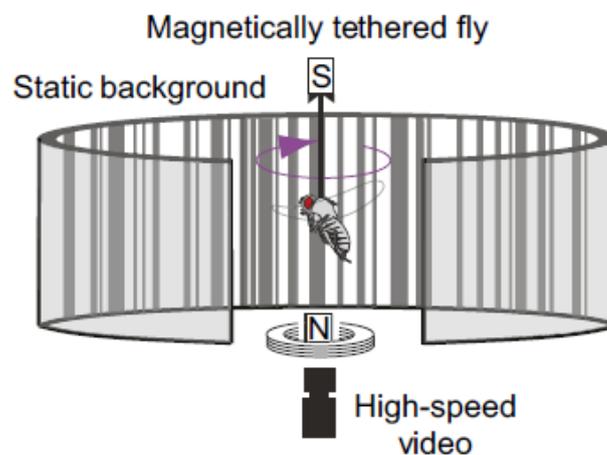


Figura 19. Esempio di un modello di tethering magnetico: le *Drosophila* vengono sospese all'interno di un campo magnetico, circondate a 360° da pannelli LED e libere di ruotare attorno all'asse di imbarcata. Una telecamera ad alta velocità registra la posizione inferiore della mosca.⁹⁶

La maggior parte degli esperimenti comportamentali con tethering hanno storicamente utilizzato stimoli composti da oggetti scuri solidi o grate in bianco e nero sovrapposte su uno sfondo bianco uniforme: questi oggetti visivi possono essere discriminati dallo sfondo visivo da qualsiasi combinazione di luminosità e contrasto. Questi segnali visivi, inoltre, possono guidare la visione del movimento e il rilevamento delle funzionalità in modo diverso.⁹⁷

Gli animali in movimento devono integrare e valutare rapidamente le informazioni sensoriali per generare azioni motorie appropriate. Ad esempio, *Drosophila* deve distinguere tra potenziali minacce, un sito di atterraggio o una fonte di cibo mentre volano attraverso ambienti complessi. Gli esperimenti di tethering, ad esempio, hanno potuto confermare che in volo *Drosophila* classifica oggetti equidistanti grandi e piccoli con comportamenti diversi: un oggetto come una barra verticale alta evoca un comportamento di approccio mentre, un oggetto piccolo suscita evitamento, e genera un flusso ottico che può essere trasmesso a circuiti di fuga appropriati per innescare la camminata all'indietro, il salto e/o il volo.⁹⁸

Degli studi hanno dimostrato che le mosche tetherizzate, libere di ruotare attorno all'asse di imbardata, eseguono saccadi del corpo di un determinato tipo verso una barra verticale alta, e il movimento e la dinamica di queste saccadi può essere prevista integrando la posizione angolare della barra rispetto all'asse anteriore della mosca nel tempo. Questi risultati sono coerenti con un modello in cui il cervello della mosca integra temporalmente la posizione angolare della barra rispetto al suo asse corporeo nel tempo, fino a quando questo valore raggiunge una soglia, per innescare una saccade verso la barra.⁹³

In uno studio di Frye è stato osservato il comportamento visuo-motorio in *Drosophila melanogaster* in condizioni di tethering dal punto di vista rigido e magnetico, per rivelare come si genera avversione per un piccolo oggetto in volo: quest'avversione è abilitata da saccadi avversive e da movimenti fluidi, che variano con il tipo di stimolo. I diversi approcci sperimentali utilizzati sono stati progettati per mostrare:

- 1) Le risposte dello sterzo saccadico (picchi nel cambiamento dell'ampiezza del battito alare, (Δ WBA) da parte di una mosca rigidamente tetherizzata in risposta al movimento sinusoidale dell'oggetto centrato in una posizione azimutale fissa;
- 2) L'orientamento della saccade e la regolazione dell'ampiezza da parte delle mosche in risposta a oggetti di dimensioni variabili in tutte le posizioni azimutali;
- 3) Come le dinamiche saccadiche per l'approccio e l'evitamento degli oggetti si mappano sul comportamento delle mosche che operano nel modello di tethering magnetico.⁹⁹

Per quanto riguarda il modello di tethering rigido, dopo aver anestetizzato a freddo le mosche, è stato incollato un piccolo perno di tungsteno sul torace usando colla attivata dai raggi UV, e dopo circa un'ora le mosche sono state poste all'interno di un'arena di volo cilindrica. Per quanto riguarda il modello di tethering magnetico, invece, le mosche sono state anestetizzate a freddo raffreddandosi a circa 4°C e successivamente sono stati incollati sul torace della mosca perni in acciaio inossidabile applicando colla attivata dai raggi UV, e come in precedenza l'esperimento è stato effettuato dopo almeno un'ora.⁹⁹

Nel sistema di tethering rigido, le mosche sono state poste all'interno di un'arena di volo cilindrica, il quale sistema è stato descritto da Reiser e Dickinson. Il display consisteva in una schiera cilindrica di 96×32 LED che sottendevano 330° orizzontalmente e 94° verticalmente. Un diodo a infrarossi è stato utilizzato per proiettare la luce sulle ali battenti, proiettando un'ombra su un sensore ottico. Un analizzatore di battito alare ha trasformato il segnale del sensore ottico in un segnale proporzionale al WBA dell'ala sinistra sottraendo quello dell'ala destra. I segnali Δ WBA dell'analizzatore ottico sono stati acquisiti a 1000 Hz (figura 13).¹⁰⁰ L'oggetto “definito dal movimento” era composto da strisce verticali con un numero uguale di colonne ON e OFF sovrapposte su uno sfondo con le stesse statistiche, cioè un uguale numero di colonne ON e OFF. Per quantificare in che modo l'altezza della barra influisca sulla valenza e sull'ampiezza del picco, è stata utilizzata la metodologia StaF (Spatio-Temporal Active Field).⁹⁹

Il sistema di tethering magnetico, invece, è stato descritto da Bender e Dickinson: il display consiste in una serie di diodi emettitori di luce 96×16 (LED) che avvolgono la mosca, sottendendo 360° orizzontalmente e 56° verticalmente. Le mosche erano sospese tra due magneti, consentendo una rotazione libera lungo l'asse verticale (asse di imbardata) e illuminate dal basso con una serie di otto LED da 940nm. La posizione angolare della mosca all'interno dell'arena è stata registrata a 160 fotogrammi s⁻¹ con una telecamera sensibile agli infrarossi (IR) posizionata direttamente sotto la mosca (figura 20).¹⁰¹

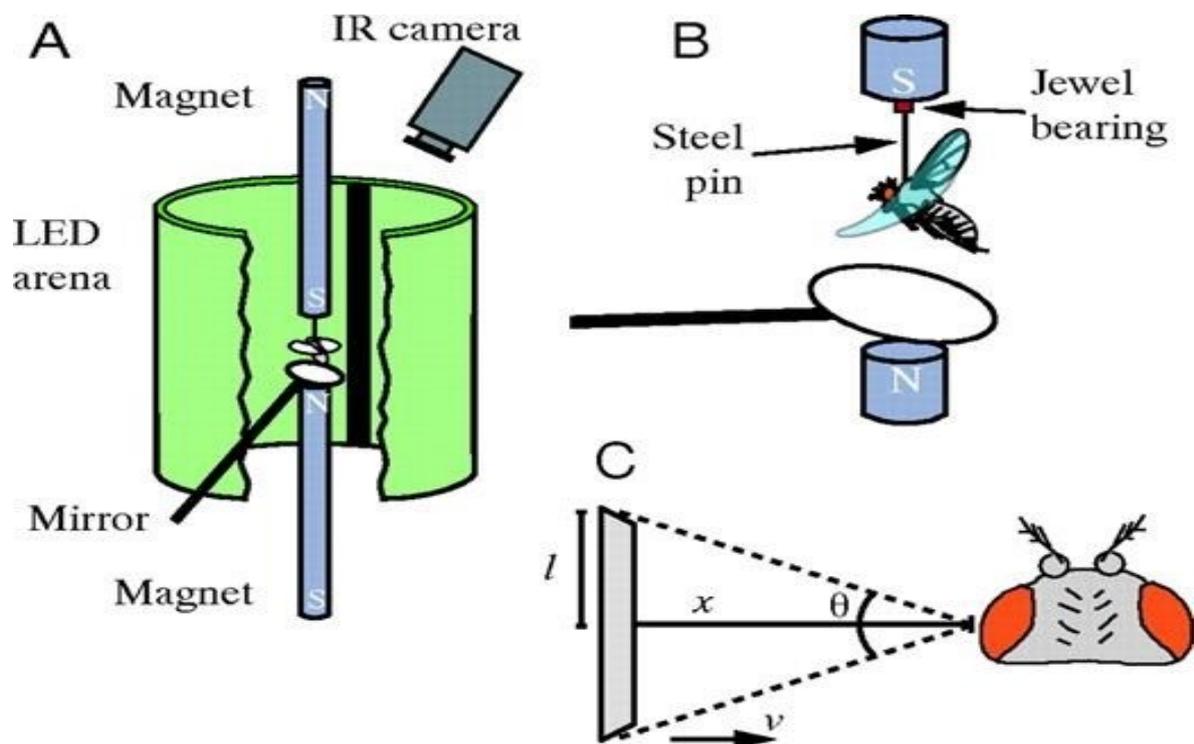


Figura 20. Design sperimentale dello studio di Benzer e Dickinson. (A) L'orientamento della mosca è stato determinato a 101 Hz con una fotocamera IR e un software in tempo reale. La stimolazione visiva è stata fornita da una matrice 32×64 di LED avvolta in un cilindro attorno alla mosca legata. N=nord magnetico; S=sud. (B) Le mosche erano incollate a un perno d'acciaio, che era incastonato in un cuscinetto e tenuto in un campo magnetico in modo che le mosche potessero ruotare solo attorno al loro asse di imbardata funzionale. (C) Le mosche sono state stimolate con quadrati incombenti virtuali. L'andamento temporale dello stimolo visivo (θ) era proporzionale a x , la distanza tra lo stimolo e l'occhio, determinata dalla mezza lunghezza del bordo del quadrato ($l=10$ cm), dalla velocità di avvicinamento v e dall'accelerazione.

Ogni esperimento è iniziato provocando una rotazione sostenuta della mosca ruotando un panorama visivo in senso orario o antiorario per 30s a 120°s^{-1} . Questo stimolo ha suscitato una forte risposta di rotazione optomotoria con saccadi occasionali. Per studiare le risposte delle mosche alle barre alte e corte, è stata ruotata una barra definita dal movimento, larga 8 pixel (30°) su uno sfondo generato casualmente di pixel "ON" e "OFF". La posizione azimutale iniziale della barra nell'arena è stata generata da una sequenza pseudo-casuale.⁹⁹ Considerando i risultati, le risposte comportamentali misurate nei due modelli di tethering, alla presentazione di una barra alta e di una barra corta, suggeriscono che le risposte di orientamento al volo di avvicinamento e avversione in *Drosophila* sono guidate da processi che suscitano saccadi con dinamiche distinte. I risultati dimostrano che:

- 1) La classificazione di piccoli oggetti da parte del sistema visivo emette saccadi e movimenti fluidi, che dipendono dal tipo di stimolo;
- 2) Un piccolo oggetto innesca saccadi più avverse;

- 3) Le saccadi di avversione di piccoli oggetti hanno dinamiche e meccanismi di innesco significativamente diversi dalle saccadi di tracciamento delle barre.

Pertanto, tramite esperimenti di tethering di vario tipo è stato confermato che il comportamento di avversione dei piccoli oggetti in volo è mediato in parte dalle saccadi del corpo.⁹⁹

Drosophila esegue saccadi corporee cambiando direzione di circa 90° in circa 70 ms. Nel volo libero, l'espansione visiva può evocare saccadi e le svolte simili a movimenti saccadici sono innescate da stimoli simili anche nelle mosche tetherizzate. Tuttavia, poiché i giri nelle mosche tetherizzate rigidamente seguono un corso temporale molto più lungo, non è noto fino a che punto questi due comportamenti condividano una base neurale comune. Una differenza fondamentale tra le condizioni di volo vincolato e di volo libero è la presenza di ulteriori segnali sensoriali in quest'ultimo, che potrebbero servire a modificare l'andamento temporale del programma motorio saccadico.¹⁰¹

Nel tentativo di chiarire questa condizione, in uno studio di Mayer sono state tetherizzate le mosche a un filamento flessibile in modo tale che le mosche potessero ruotare attorno al loro asse di imbardata ma fossero contemporaneamente fissate nello spazio. Le mosche in questa disposizione mostravano comportamenti saccadici, ma gli autori non sono stati in grado di identificare uno stimolo visivo sufficiente per evocarli, il che oscura una chiara connessione tra il comportamento di volo libero e la sua presunta controparte di volo vincolato.¹⁰² Inoltre, le saccadi “fittizie” in *Drosophila* rigidamente legate durano circa 500ms, circa dieci volte più lunghe delle saccadi a volo libero, e la durata è quasi indipendente da qualsiasi feedback visivo. La spiegazione più probabile per la differenza nel corso del tempo tra saccadi in volo libero e in volo sotto tethering è un ruolo del feedback sensoriale nel terminare il programma motorio saccadico, ma le modalità responsabili di questo feedback non sono state identificate.¹⁰¹

Questo è stato affrontato anche da uno studio di Bender e Dickinson. Nel loro protocollo, già descritto precedentemente, è stata tetherizzata una mosca a un perno d'acciaio posizionato all'interno di un campo magnetico, consentendo alla mosca di ruotare liberamente attorno al suo asse di imbardata. Questa disposizione fornisce un feedback sensoriale naturalistico dalla rotazione dell'imbardata, che è mediata dal sistema visivo e dalle cavezze, ed è stato osservato che le saccadi sono abbastanza simili alle saccadi di volo libero e quindi probabilmente derivano dallo stesso programma motorio. È stato inoltre controllato l'ambiente visivo utilizzando un panorama elettronico per verificare direttamente se e come determinati stimoli visivi suscitano saccadi: i risultati mostrano che gli oggetti incombenti evocano saccadi con una probabilità indipendente dalla forma dell'oggetto.¹⁰¹

4. SCOPO DELLA TESI

Drosophila melanogaster rappresenta uno degli organismi modello a livello scientifico sotto molti punti di vista, ed è molto utilizzato come modello per lo studio di funzioni neurofisiologiche, sia semplici che complesse. È un organismo facile da manipolare, non ci sono problematiche di tipo etico o di sicurezza ed è un'ottima scelta per lo studio di funzioni comportamentali.

In questa tesi sono state analizzate le risposte visuo-motorie di *Drosophila melanogaster*, in particolar modo soffermandosi sulle risposte motorie date dalla testa di *Drosophila*, nei confronti della presentazione di stimoli visivi chiamati *Random Dots Motion kinematograms (kRDM)*, che come sopra citato sono degli stimoli visivi composti da una serie di punti neri (*dots*) in movimento su uno sfondo bianco, dei quali la percentuale che si muove nella stessa direzione viene espressa mediante la coerenza. La percentuale di dots in movimento coerente, rispetto ai dots in movimento casuale (o di rumore), variava in modo prestabilito tra i vari trial dell'esperimento, in modo da osservare le risposte visuo-motorie di *Drosophila* al variare di questi parametri.

All'interno dell'esperimento, i soggetti di *Drosophila* fissano i vari stimoli visivi che vengono presentati mediante un processo di attenzione selettiva, permettendo di selezionare un determinato punto in movimento rispetto ad altri, e ciò avviene mediante il compimento di una saccade, un movimento corporeo già definito in precedenza, che permette all'animale di orientare la vista su un determinato oggetto visivo mediante un salto da un punto all'altro. La saccade a livello dell'essere umano è un movimento oculare molto specifico, possibile grazie all'azione della fovea, mentre a livello di *Drosophila* è un movimento dell'intero corpo in quanto essendo un animale inferiore, che non presenta la fovea, muove l'intero corpo quando cerca di percepire un determinato stimolo al quale viene sottoposto: *Drosophila* non può muovere gli occhi indipendentemente dalla testa e dal corpo.

Registrando l'immagine in movimento di *Drosophila* durante l'esperimento, ci si è soffermati sui movimenti saccadici di *Drosophila* a livello della testa, che si orienta assieme agli occhi, alle ali e al corpo in modo concorde. Sono stati registrati i movimenti della testa di *Drosophila*, l'ampiezza delle due fasi saccadiche, ovvero la fase lenta e la fase veloce, e si è cercato di stabilire una connessione tra lo stimolo kRDM presentato, la sua coerenza, il suo movimento (verso sinistra o destra) e il movimento della testa di *Drosophila*.

Lo scopo della tesi è quindi di verificare se in *Drosophila* vengono attuati dei comportamenti simili all'uomo per ciò che riguarda la percezione di determinati stimoli visivi, di stabilire quindi se *Drosophila* riesce a percepirli, a che livelli di coerenza li percepisce e come varia il movimento della testa di *Drosophila* nei confronti dell'esperimento.

5. MATERIALI E METODI

5.1 MODELLO SPERIMENTALE

Come modello sperimentale sono state usate femmine di *Drosophila melanogaster* del ceppo Berliner (flies), con un'età compresa tra i 4 e i 7 giorni dal momento in cui si passa dallo stadio larvale allo stadio di adulto. Le flies sono state mantenute ad una temperatura di circa 25°C all'interno di contenitori di plastica (vials) contenenti il mezzo nutritivo (vedi 5.1.1 Nutrizione). Per la sperimentazione si è ricorso a flies aventi più di 10 giorni di vita che sono state inizialmente trasferite su una *vial* vuota con la sola presenza di nutrimento, per lasciare loro il tempo di deporre le uova e poi essere successivamente spostate all'interno di altre *vials* per poter continuare il mantenimento.

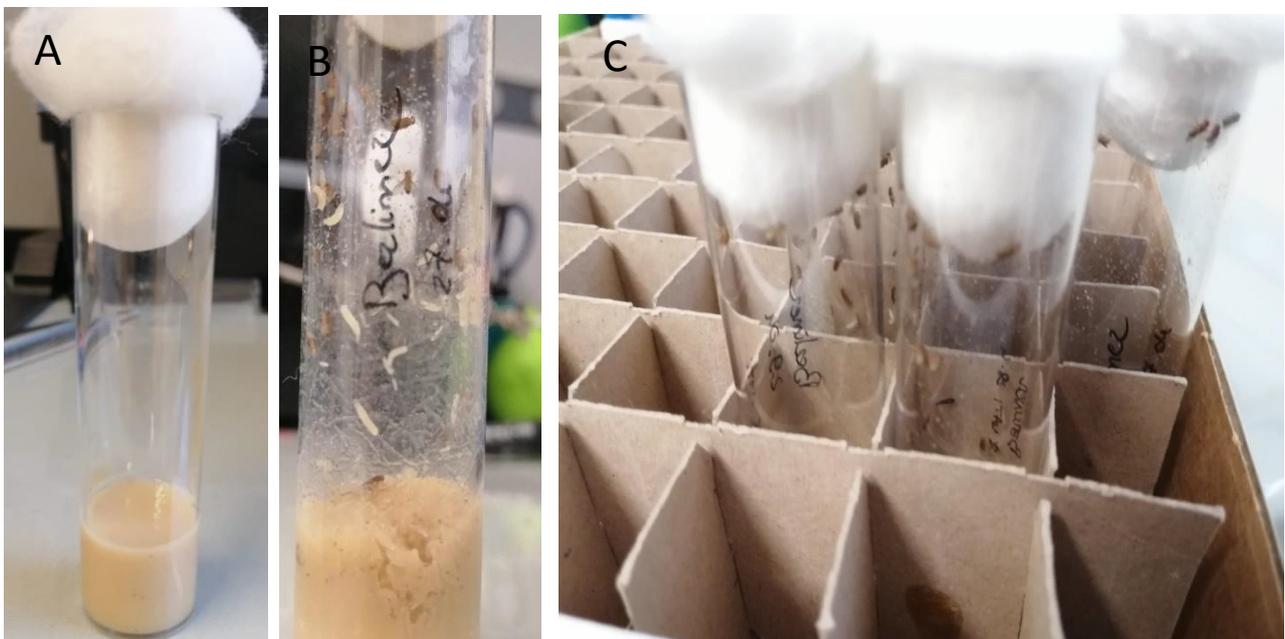


Figura 21. A) *Vial* chiusa contenente solamente il mezzo nutritivo. B) *Vial* chiusa contenente il mezzo nutritivo, flies larve e adulte. C) Diverse *vials* chiuse contenenti mezzo nutritivo e flies adulte, poste all'interno di una scatola di cartone.

Questa operazione è stata eseguita ogni 3 giorni, in modo da permettere di avere una produzione continua di soggetti da testare, i quali nascono solitamente 10 giorni dopo il giorno della deposizione delle uova. Con un pennarello, in ogni *vial* è stata sempre segnata la data in cui sono stati inserite le flies e la data in cui queste sono stati spostati in un'altra *vial*, in modo da sapere che in quell'arco temporale di 3 giorni sono state deposte le uova. Dopo circa 10 giorni, nel momento in cui nascono le flies è stato appuntato, sulla *vial*, il giorno della nascita, e dopo circa 4-6 giorni dal passaggio allo stato adulto queste sono state utilizzate per la sperimentazione.

Inoltre, per poter garantire il mantenimento della specie, ogni 3-4 circa settimane i moscerini in laboratorio devono essere in una nuova *vial* pulita, all'interno del quale è presente del nuovo mezzo nutritivo precedentemente tenuto in frigorifero. Questa operazione di trasferimento consiste nel dare

dei colpetti verso il basso alla *vial*, posta su un tappetino morbido per evitare eventuali spaccature, affinché i moscerini si depositino sul fondo e non volino nel momento dell'apertura della *vial*. A questo punto, la *vial* viene aperta rimuovono rapidamente il batuffolo di cotone posto al di sopra e successivamente si fanno combaciare le aperture delle due *vial*, quella vecchia e quella nuova, per favorire il trasferimento delle flies che tendono a muoversi verso l'alto, entrando nella nuova *vial* che viene successivamente rimossa e chiusa con il batuffolo di cotone.

5.1.1 NUTRIZIONE

L'alimentazione delle flies è basata sui lieviti presenti sulla frutta in fermentazione. Per realizzare il mezzo nutritivo per le flies in laboratorio è sufficiente inserire del saccarosio e del lievito liofilizzato, con l'aggiunta di un acido organico debole che agisca da conservante. Per la realizzazione del mezzo di nutrimento in laboratorio, partendo da una base di circa 1L di acqua, sono necessari i seguenti ingredienti:

- 72g di farina di mais
- 79,3g di zucchero
- 50g di lievito secco
- 8,5g di agar
- 13,5ml di nipagina
- 3ml di acido propionico

Mentre, la strumentazione che occorre è:

- Becher
- Paiolo in rame
- Cilindro graduato
- Bilancia
- Micro-pipetta AP 1000
- Piastra riscaldante
- Cucchiaino di legno
- Termometro

Procedimento:

Tramite l'utilizzo di un becher come contenitore inizialmente si misura 1L di acqua. Non è necessario che l'acqua sia esattamente 1L, spesso è opportuno eccedere di 0,1-0,2L per far sì che l'alimento finale non sia eccessivamente denso. In seguito, con l'utilizzo di un becher e di una bilancia, vanno pesati in ordine lo zucchero, la farina di mais, il lievito secco e l'agar, per poi versare tutti i componenti all'interno del paiolo, mescolando nel frattempo per evitare la creazione di addensamenti e per evitare che il composto si attacchi sul fondo. A questo punto, si pone il preparato sulla piastra, accesa ad una temperatura di 250-300°C.

Una volta raggiunto il punto di ebollizione della miscela, si deve impostare un timer di 7-9 minuti e si continua a mescolare, per poi aspettare che si raffreddi il composto. Durante il raffreddamento è consigliato continuare a mescolare per evitare che il composto si attacchi sul fondo, e occorre aspettare e misurare con un termometro la temperatura. Una volta che questa raggiunge i 50-55°C, vanno aggiunti i liquidi conservanti, ovvero la nipagina e l'acido propionico, entrambi da tenere in frigorifero fino al momento dell'utilizzo, a differenza degli altri composti precedentemente utilizzati che possono essere mantenuti senza problemi a temperatura ambiente.

Sia la nipagina che l'acido propionico vengono prelevati utilizzando una micro-pipetta manuale AP 1000, ovviamente cambiando il puntale della pipetta quando si passa da un composto all'altro per evitare contaminazioni. I liquidi vengono versati all'interno della miscela paiolo alla temperatura desiderata, si mescola e poi il composto è pronto per essere utilizzato. Il contenuto viene versato all'interno di un becher di vetro con manico, in modo tale da favorire il successivo riempimento delle *vials* fino a circa 1/4 del loro volume, in modo che la quantità non sia né troppa né troppo poca per la crescita delle flies. Conclusa la procedura, le *vials* vengono riposte in scatole di cartone munite di scomparti, e fino al momento di solidificazione (generalmente 24h dopo), si ricopre la scatola con un telo bianco in modo che moscerini o contaminanti non possano entrare.

Il giorno dopo, ogni *vial* viene tappata con un batuffolo in cotone e si pone in frigorifero fino al successivo utilizzo.

5.2 PREPARAZIONE DEI SOGGETTI SPERIMENTALI

Per poter eseguire in modo adeguato l'esperimento, è necessario che le flies della specie Berliner vengano innanzitutto anestetizzate. Per poter anestetizzare i soggetti, questi vengono spostati in una *vial* vuota che viene posta in ghiaccio per un paio di minuti, il tempo necessario affinché la fly perda i sensi: questo tipo di anestesia è molto meno pesante rispetto a quella che utilizza la CO₂, in quanto la fly rimane incosciente soltanto per pochi minuti (Figura 22). Dopo il bagno di ghiaccio, la *vial* viene aperta e tramite un pennellino viene raccolta una fly (prestando attenzione che sia una femmina)

anestetizzata che posta su una cella di Peltier con sopra adagiato un foglio di carta umida, il tutto collegato ad un supporto che mantiene una bassa temperatura.

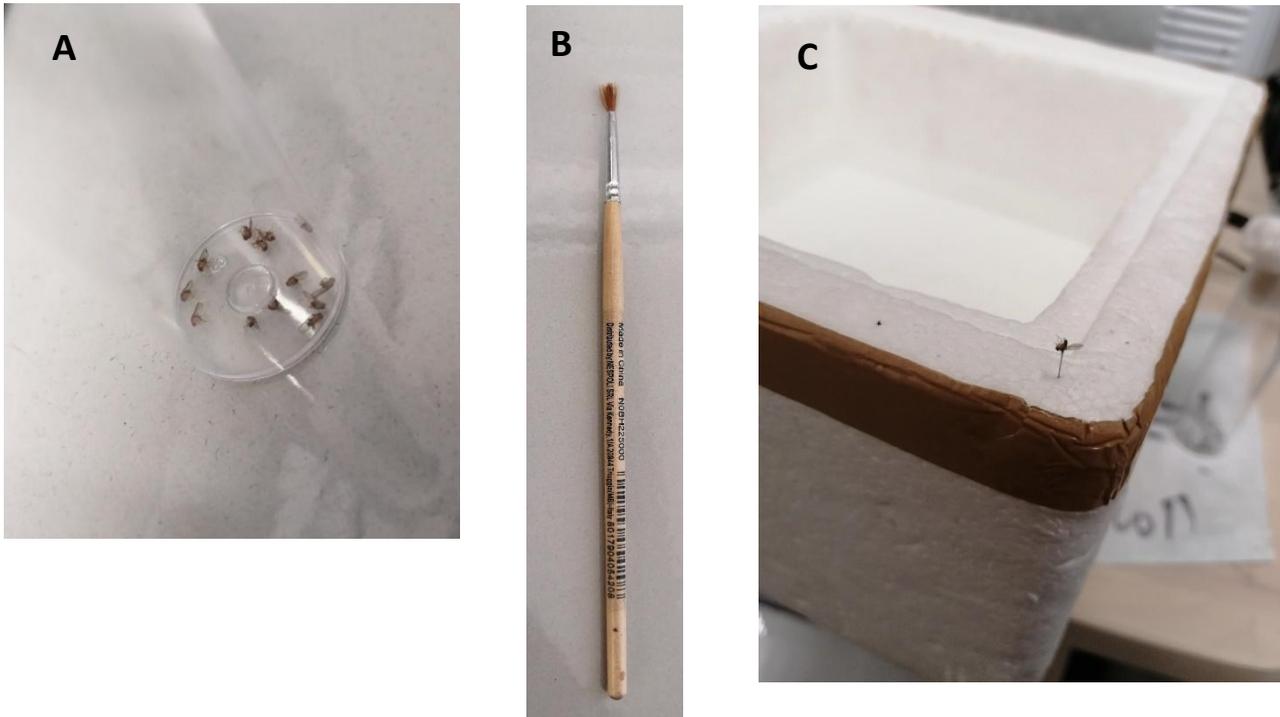


Figura 22. A) Vial vuota contenente flies femmine adulte anestetizzate. B) Pennellino con il quale si prende una fly per l'esperienza. C) Scatola di polistirolo riempita di ghiaccio che funge da bagno di ghiaccio nel quale le mosche vengono anestetizzate.

Per posizionare la fly ci si avvale dell'utilizzo di un microscopio, in modo tale da sistemarla in modo esattamente parallelo ad una delle corsie della cella di Peltier, con la testa della fly rivolta verso destra e con la parte posteriore del corpo rivolta verso l'osservatore. Con l'obiettivo di ricreare il modello di volo di *Drosophila*, dopo che questa è stata sistemata nella cella, si utilizza un micromanipolatore al quale posta una piccola parte di plastilina, sulla quale verrà adagiato uno spillo (Austerlitz insect pins®, 0,20 mm) con un'angolazione di circa 60° rispetto all'asse principale della fly. Lo spillo è necessario per attaccare la fly prendendola esattamente poco sotto la testa, verso l'inizio della parte posteriore del corpo: per attaccare, viene utilizzata una colla attivata dai raggi UV, della quale è importante apporne la corretta quantità, in quanto nel caso in cui fosse troppa potrebbe causare la compressione del torace della fly impedendone il funzionamento delle ali e quindi del volo, mentre nel caso in cui fosse poca si rischierebbe di non riuscire ad attaccare la fly in modo corretto e quindi questa si potrebbe staccare.

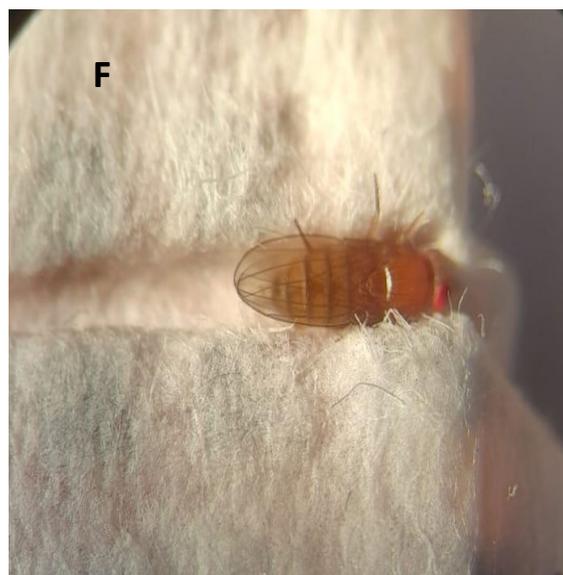
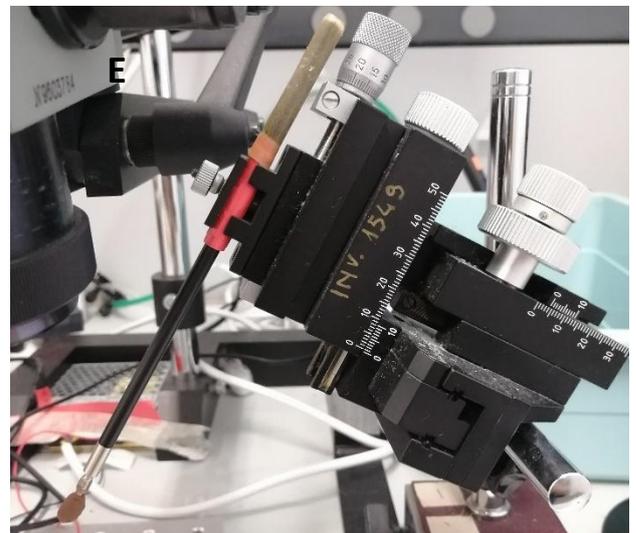
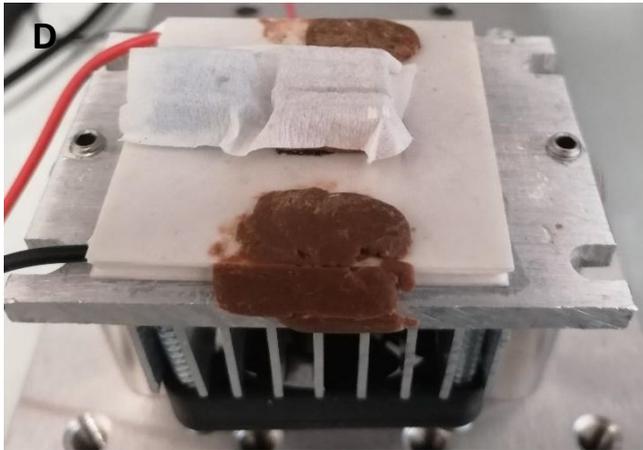
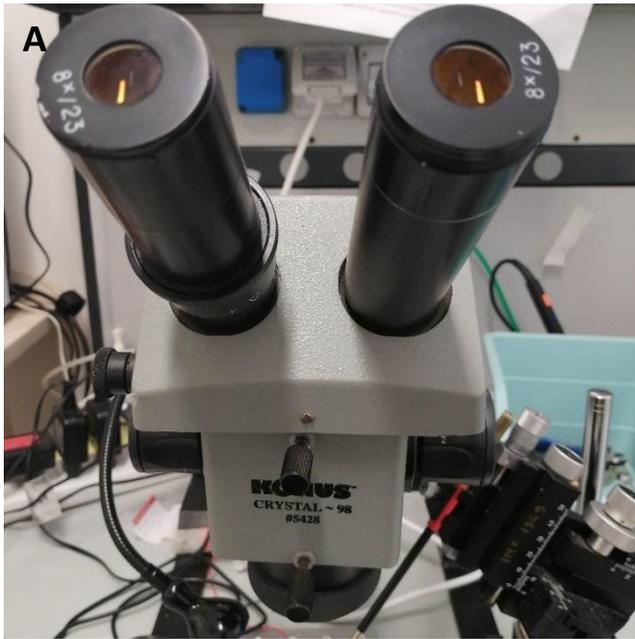


Figura 23. *A) Microscopio. B) Colla UV. C) Spilli. D) Cella di Peltier. E) Micromanipolatore. F) Veduta al microscopio della fly stesa su una delle corsie della cella di Peltier.*

Dopo aver incollato e aver utilizzato dei raggi UV per circa 1 minuto per far aderire la colla alla fly, si utilizza il micromanipolatore per estrarre lo spillo con la fly, come si nota nella Figura 24, e questa viene raccolta con una pinzetta per poi porla all'interno dell'apparato sperimentale.

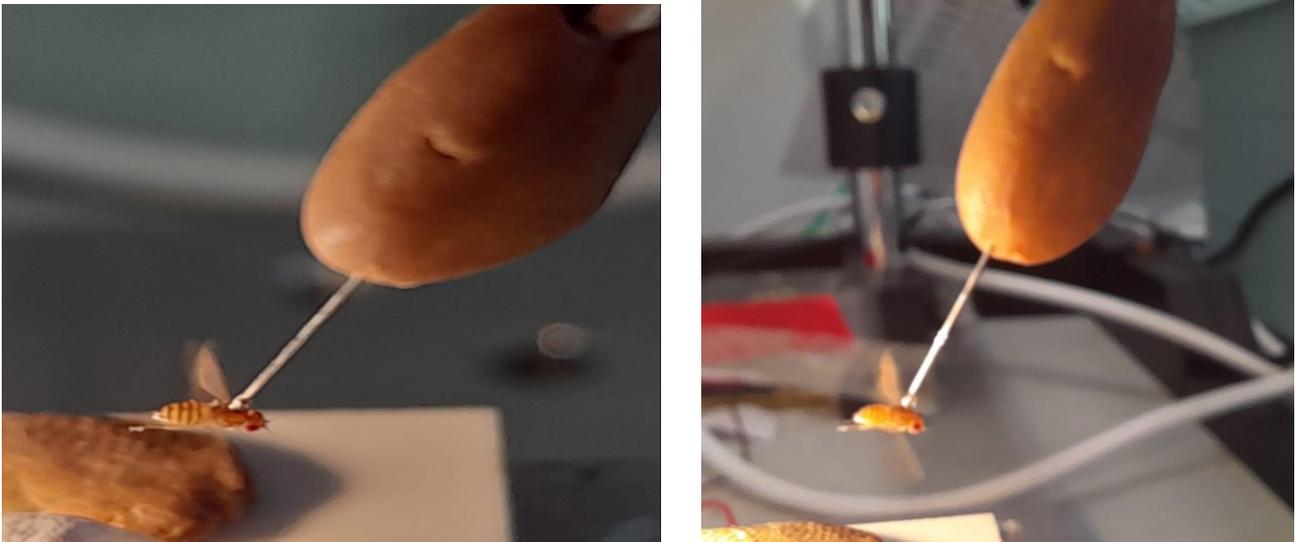


Figura 24. *Due diverse vedute di Drosophila attaccata allo spillo.*

5.3 SETUP SPERIMENTALE

L'apparato sperimentale è riportato in Figura 25. In una camera che poi viene coperta da un telo, per poter ricreare l'effetto di un'arena chiusa per la fly, sulla destra è presente un proiettore (Figura 26.A) che servirà per proiettare, sullo schermo bianco presente a sinistra (Figura 26.B). Sulla sinistra è presente l'apparato in cui viene immobilizzata la fly (Figura 26.C.1-2). Mediante l'utilizzo di un micromanipolatore al quale viene, anche in questo caso, inserita una piccola parte di plastilina, viene immobilizzato lo spillo in modo da far sì che la fly orienti il suo sguardo nei confronti del centro dello schermo bianco, e che possa osservare a sinistra e a destra alle rispettive parti esterne dello schermo. La fly viene illuminata da dei farette LED (Figura 26.C.3), collegati tramite un circuito (Figura 26.D), in modo da evidenziare in modo molto chiaro sia la testa che le ali, le parti sulle quali verrà effettuata l'analisi al computer e che quindi devono risaltare in modo ben definito rispetto allo sfondo. In basso rispetto alla fly è posta una videocamera Ximea (Figura 26.C.4) che serve per riprenderla in ciascuno dei suoi movimenti durante l'esperimento, videocamera che filma a circa 80 fps e che è collegata al computer in modo tale da mostrare l'immagine e i movimenti della fly in tempo reale e per poterne successivamente modificare la posizione tramite il micromanipolatore, spostandola sugli assi X, Y e Z per posizionarla al centro e capace di ruotare a sinistra e a destra, o l'illuminazione tramite i farette LED per illuminare in modo adeguato corpo, testa e ali.

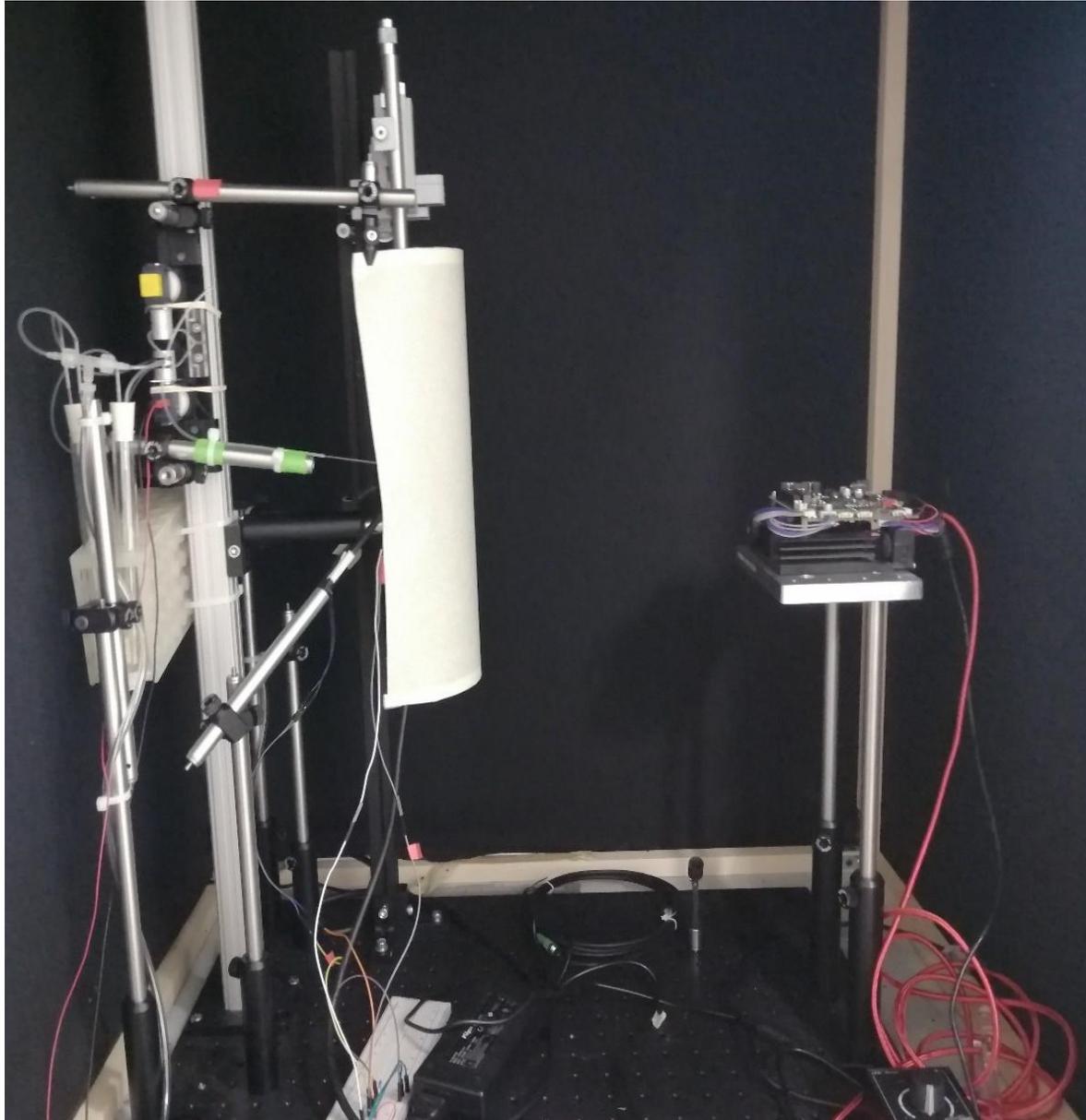


Figura 25. *Insieme delle parti che compongono l'apparato sperimentale all'interno dell'arena.*

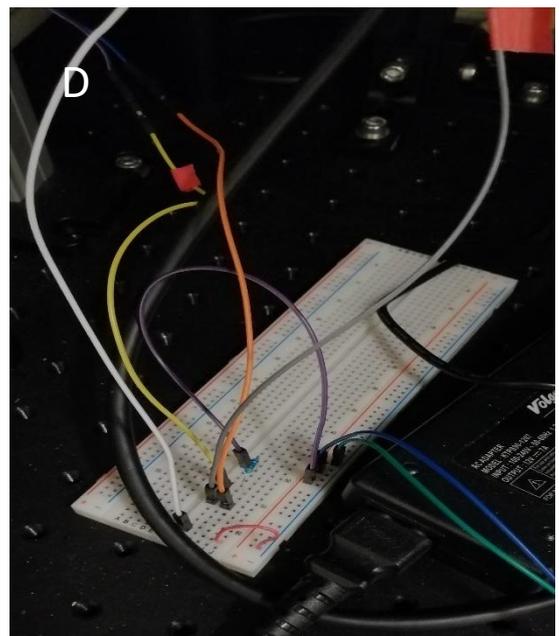
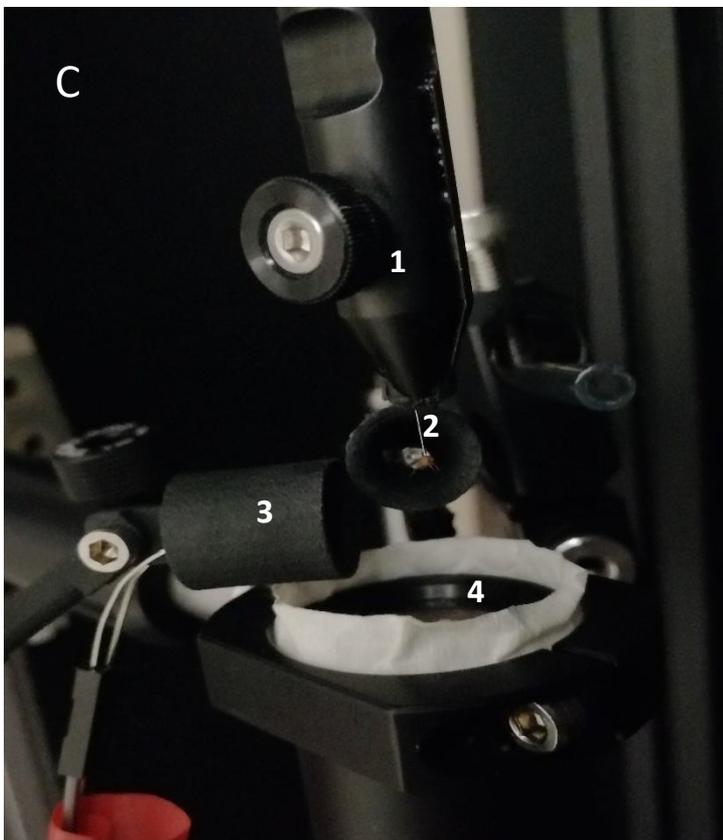
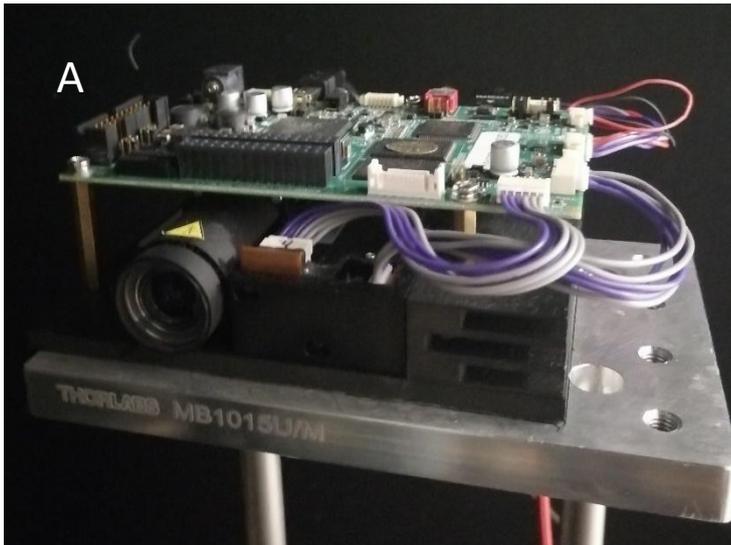


Figura 26. *Apparato strumentale. A) Proiettore. B) Schermo bianco. C) 1. Micromanipolatore. 2. Spillo con la Drosophila. 3. Faretto LED. 4. Lente. D) Circuito al quale sono connessi i LED.*

5.4 STIMOLO VISIVO E REGISTRAZIONE DEL COMPORTAMENTO

L'apparecchiatura descritta, per poter effettuare l'analisi, è collegata a due computer. Il primo computer viene utilizzato per far partire lo stimolo visivo utilizzato nell'esperimento, uno stimolo di tipo Random Dots Motion kinematogram (kRDM), che viene generato tramite uno script utilizzando il linguaggio Python. Lo stimolo visivo dura circa 30 minuti, e consiste in 1000 dots con una life-span di 1 secondo, che possono muoversi in maniera casuale o seguendo una determinata direzione, cioè verso destra o verso sinistra rispetto alla fly. La proporzione di dots che si muove nella stessa direzione viene espressa tramite la coerenza: durante l'esperimento sono stati presentati i livelli di coerenza a rispettivamente 0.2 (cioè, il 20% dei dots si muove coerentemente), 0.4, 0.6, 0.8, fino ad arrivare al valore di coerenza 1 (cioè, tutti i dots si muovono nella stessa direzione).

Il protocollo di stimolazione per ciascuno stimolo è stato il seguente: 30 secondi con dots a coerenza 0, 20 secondi di stimolo visivo (cioè la coerenza selezionata), 30 secondi dots a coerenza 0, 30 secondi di schermo bianco. L'intero protocollo è stata ripetuto 3 volte per ogni soggetto. I dots hanno una grandezza pari a 20° e si muovono ad una velocità di circa $113^\circ/\text{s}$ gradi. Nel secondo computer, al quale è collegata la videocamera, è sia possibile osservare l'immagine della fly (regolandone la posizione e la luce manualmente) tramite l'applicazione Ximea, che effettuare la registrazione dell'esperimento. La fly che viene sospesa nell'apparecchiatura deve essere tracciata in ogni suo movimento di corpo, testa e ali nei confronti dello stimolo visivo che viene presentato.

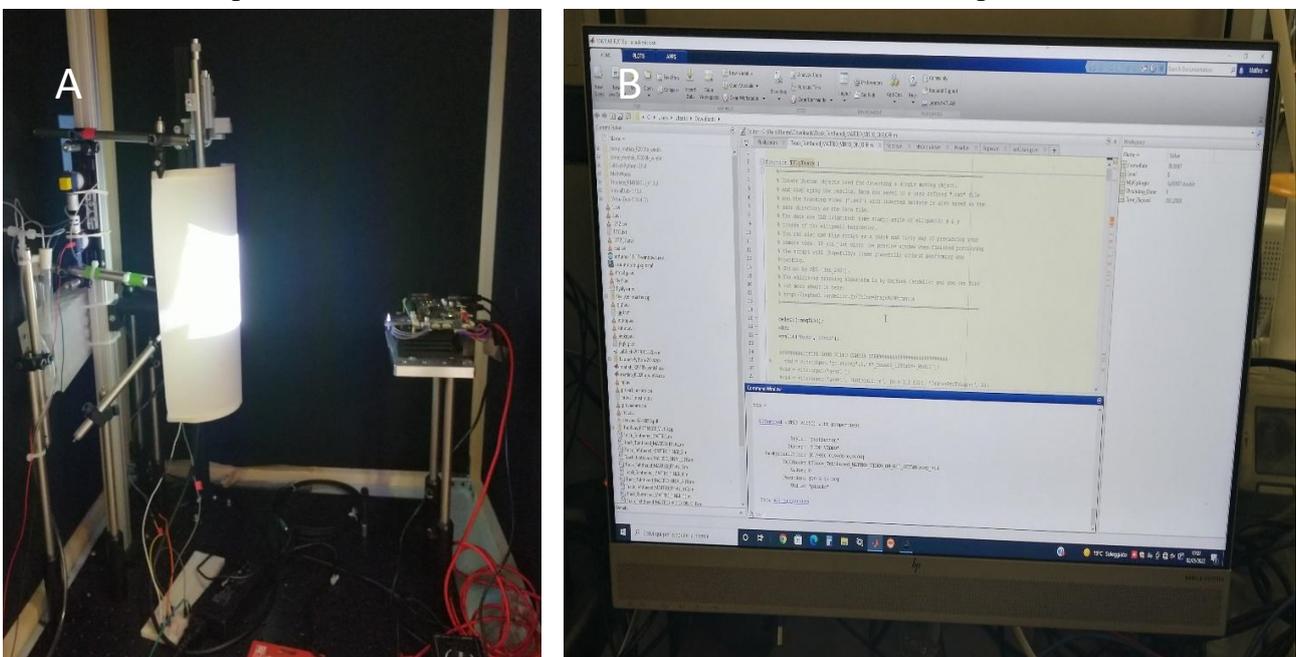


Figura 27. A) Esperimento in tempo reale, il proiettore è acceso e sta proiettando lo stimolo sullo schermo; all'interno c'è la fly attaccata allo spillo che sta osservando. B) Script di MATLAB utilizzato per la registrazione video dell'esperimento.

Questo computer è collegato tramite un LabJack U3 e un Arduino Micro, e per eseguire la registrazione si utilizza un programma che è stato sviluppato su MATLAB, tramite l'utilizzo di uno

script che riesce a registrare i movimenti di *Drosophila* in tempo reale e a generare successivamente un video dell'esperimento alla fine del processo. In tal modo, per ogni esperimento condotto si ottiene la registrazione video dei movimenti delle flies, che poi viene salvata sul computer per essere successivamente analizzata per osservare il tracking delle risposte saccadiche mediante un altro script di MATLAB, chiamato "Flyalyzer" (<https://github.com/michaelrauscher/flyalyzer>).

I sistemi utilizzati per generare lo stimolo visivo nel primo computer e la registrazione nel secondo computer sono interconnessi tra di loro: il programma atto alla registrazione dell'esperimento rimane in attesa, aspettando l'invio del segnale da parte dello script dello stimolo visivo, e solo dopo l'avvio di quest'ultimo inizierà la registrazione dell'esperimento in contemporanea. In tal modo, si riesce ad avere una sincronizzazione ed un allineamento delle due componenti.

Successivamente, la registrazione viene analizzata tramite Flyalyzer, che permette di tracciare i movimenti delle ali e della testa (Figura 28). Impostando i parametri, è possibile osservare i movimenti della testa delle flies ed osservare l'ampiezza del movimento saccadico della testa, che viene continuamente tracciata e successivamente registrata in un grafico a seconda degli stimoli presentati. In tal modo, per ogni soggetto e per ogni stimolo si riesce a tracciare con continuità ogni movimento che viene effettuato.

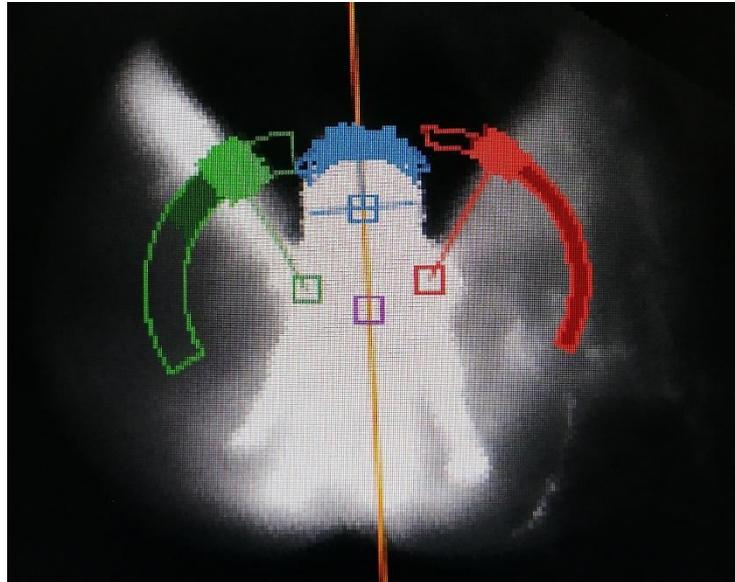


Figura 28. Esempio dell'utilizzo del software Flyalyzer. La linea arancione taglia a metà il corpo della fly per stabilirne un'asse. I quadrati rossi e verdi sono relativi rispettivamente alle ali destra e sinistra, mentre il quadrato azzurro viene impostato per tracciare i movimenti saccadici della testa.

5.5 ANALISI E ANALISI STATISTICHE

L'analisi è stata effettuata in Python, utilizzando uno script appositamente sviluppato. L'output dello script di tracking consiste in un file di testo contenente una colonna riportante l'angolo della testa rispetto al torso del soggetto per ciascun frame. Viene quindi generato un tracciato del movimento angolare della testa dell'animale durante l'intero esperimento in rapporto ai vari stimoli applicati (Figura 29).

Attraverso un processo di derivazione i movimenti angolari della testa dell'animale sono stati successivamente trasformati in picchi di velocità angolare (Figura 30). Questo processo aumenta notevolmente il rumore di fondo del tracciato che viene in parte eliminato mediante un filtro passa-basso di Butterworth con una frequenza di cutoff di 25 Hz.

L'ulteriore eliminazione del rumore di fondo per mettere in evidenza i picchi di velocità angolare corrispondenti ai movimenti della testa dell'animale, è stata effettuata misurando il rumore rimanente definito come la mediana della traccia in valore assoluto / 0.6745. Questo valore è stato utilizzato per calcolare la soglia ($4 \times$ rumore di fondo) per l'identificazione del picco di velocità della saccade.

Le saccadi sono state isolate attraverso un processo di template-matching. Da un dataset di saccadi isolate manualmente si è estratta una saccade media, questa è stata utilizzata come template per l'identificazione delle saccadi nella traccia temporale, sono state considerate quelle che correlavano per più del 0.75 con il template (Figura 31).

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il pacchetto scikit-learn per Python. Per valutare se vi fossero differenze significative tra le popolazioni abbiamo utilizzato il test di Mann-Whitney.

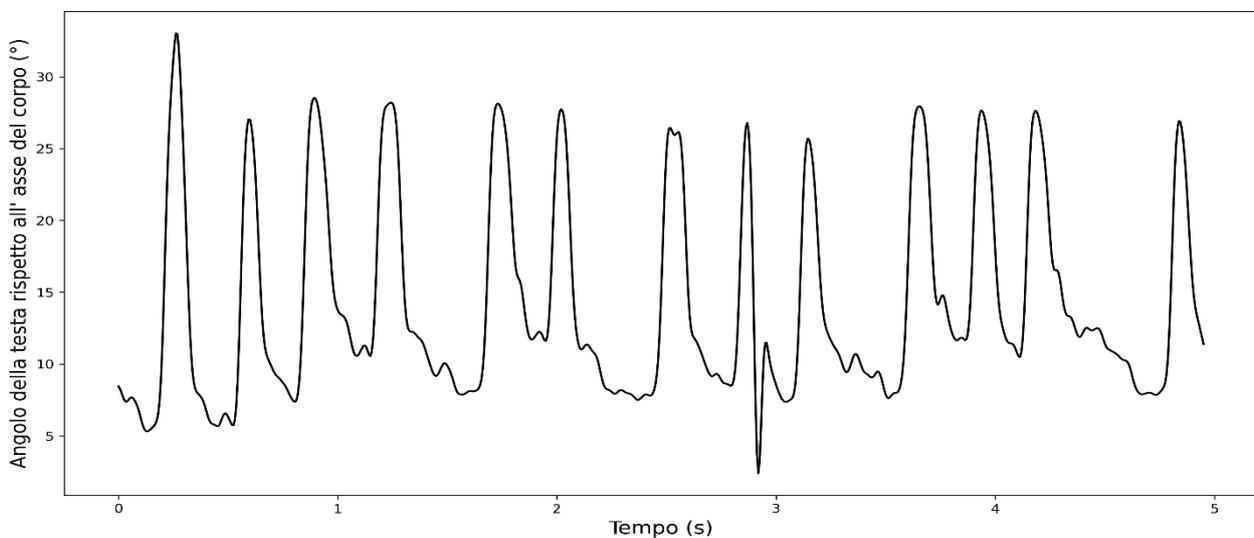


Figura 29. Nel grafico viene riportato l'angolo della testa, espresso in $^{\circ}$, rispetto all'asse corporeo nei confronti del tempo dell'esperimento.

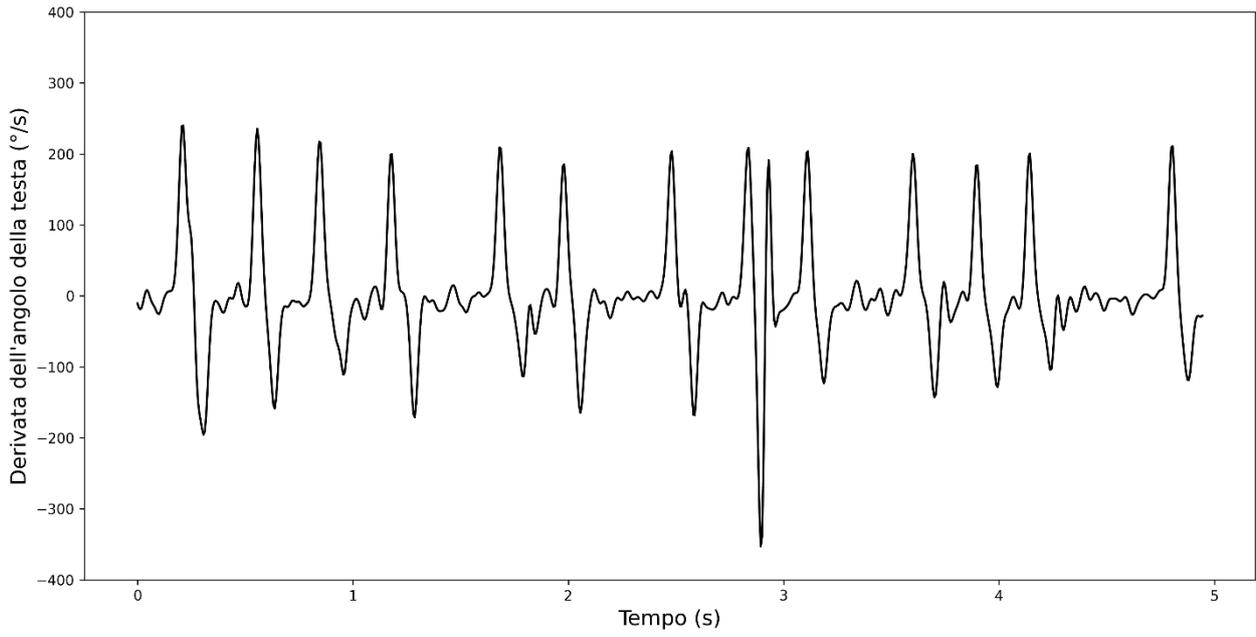


Figura 30. Derivata dell'angolo della testa, espressa in °/s, nei confronti del tempo, espresso in s.

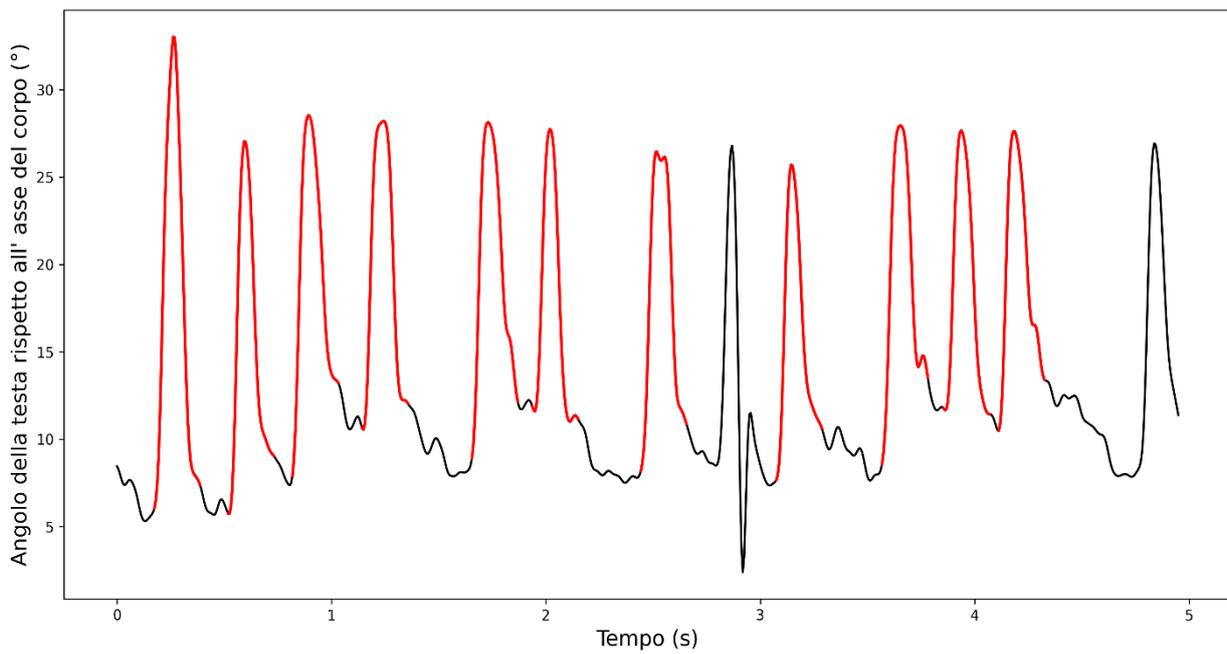


Figura 31. Identificazione delle saccadi.

6. RISULTATI

Sono state isolate le saccadi e ne sono state identificate un totale di 18178 (n soggetti=23) di cui il 34.8% (6327) durante la stimolazione.

6.1 SEZIONE 1

Il movimento saccadico è caratterizzato da un'iniziale fase veloce per seguire lo stimolo visivo e una successiva fase lenta per il ritorno al punto di partenza.

Inizialmente, si è voluto esaminare le caratteristiche cinetiche di queste due fasi analizzandone l'ampiezza media (espressa in °) e il picco di velocità per la fase veloce (espressa in °/s).

Tutti questi fattori sono stati espressi nei confronti della coerenza e della direzione dello stimolo visivo, chiedendosi se fosse presente o meno una relazione tra l'aumento della coerenza dello stimolo e i valori di ampiezza e picco registrati.

Al fine di analizzare la relazione, i risultati riportati in seguito sono espressi in termini assoluti, di conseguenza non viene presa in considerazione la direzione del movimento dei soggetti.

In tutti i risultati riportati, il colore verde è utilizzato per identificare i movimenti effettuati con lo stimolo che si muove verso sinistra, mentre il colore viola per i movimenti effettuati con lo stimolo che si muove verso destra.

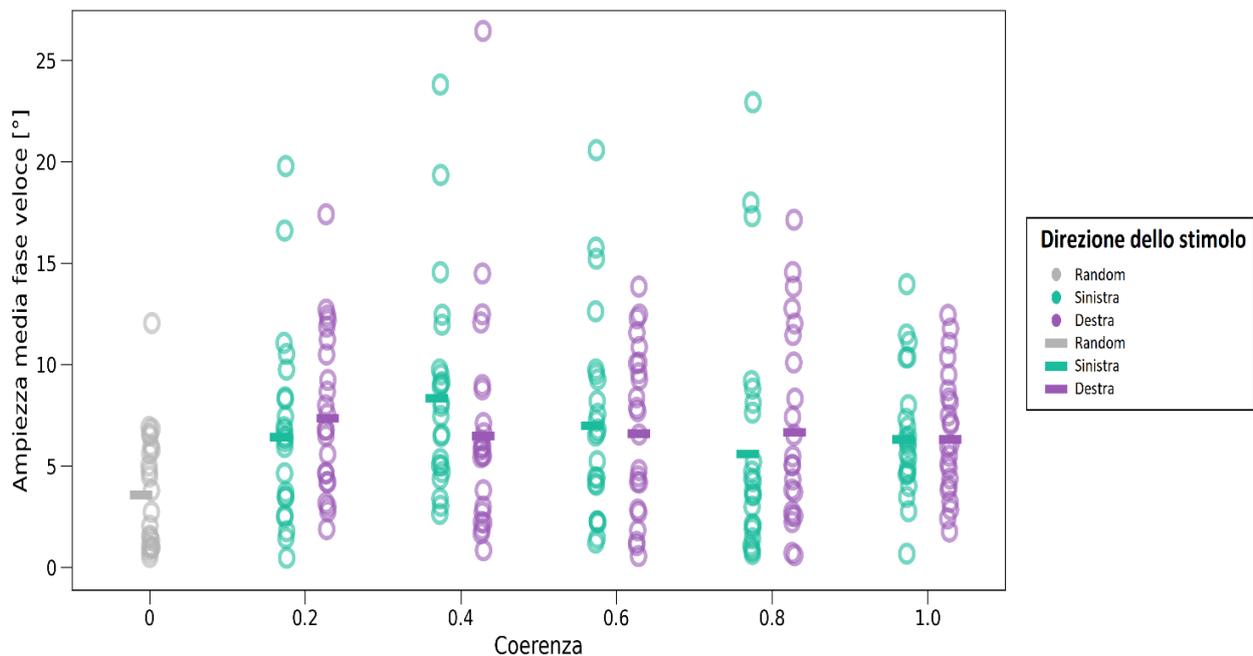


Figura 32. In questo grafico è stata riportata sulle ascisse la coerenza dello stimolo kRDM utilizzato, partendo da una coerenza allo 0% per poi arrivare al 100% mediante passaggi intermedi, mentre sulle ordinate è stata riportata l'ampiezza media in ° della fase veloce della curva saccadica. A coerenza 0 lo stimolo kRDM è totalmente casuale. I cerchi rappresentano i valori medi per ciascun soggetto. La barra rappresenta la media tra i soggetti.

In Figura 32 sono riportati i valori medi di ampiezza della fase veloce del movimento saccadico. La differenza tra i valori è significativa confrontando le ampiezze dei movimenti saccadici effettuati durante la fase di stimolazione e durante la fase a coerenza 0: coerenza 0.2 vs coerenza 0 ($U=783.0$, $p<0.01$), coerenza 0.4 vs coerenza 0 ($U=793.0$, $p<0.001$), coerenza 0.6 vs coerenza 0 ($U=768.0$, $p<0.01$), coerenza 0.8 vs coerenza 0 ($U=644.0$, $p=0.102$), coerenza 1.0 vs coerenza 0 ($U=765.0$, $p<0.01$). Non sono significative tuttavia le differenze di ampiezza tra i vari livelli di coerenza [coerenza 0.2 vs coerenza 0.4 ($U=1073.0$, $p=0.910$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.2 ($U=1045.0$, $p=0.922$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.2 ($U=859.0$, $p=0.163$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.2 ($U=992.0$, $p=0.736$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.4 ($U=1030.0$, $p=0.830$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.4 ($U=813.0$, $p=0.079$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.4 ($U=976.0$, $p=0.642$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.6 ($U=880.0$, $p=0.220$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.6 ($U=1013.0$, $p=0.864$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.8 ($U=1196.0$, $p=0.140$)].

Non vi è nessuna differenza significativa nemmeno considerando la direzione dello stimolo [coerenza 0.2 ($U=315.0$, $p=0.272$), coerenza 0.4 ($U=190.0$, $p=0.104$), coerenza 0.6 ($U=270.0$, $p=0.912$), coerenza 0.8 ($U=305.0$, $p=0.242$), coerenza 1.0 ($U=255.0$, $p=0.973$)].

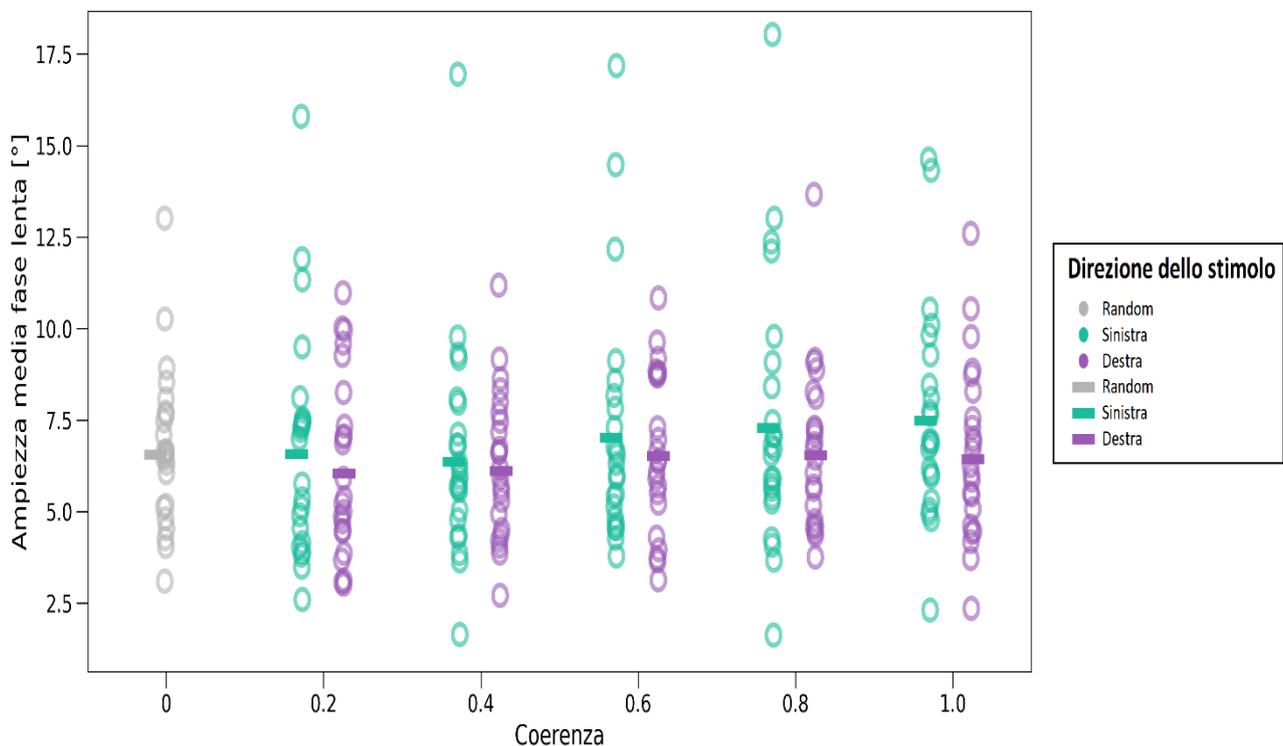


Figura 33. In questo grafico è stata riportata sulle ascisse la coerenza dello stimolo *kRDM* utilizzato mentre sulle ordinate è stata riportata l'ampiezza media in $^{\circ}$ della fase lenta della curva saccadica.

Nella Figura 33 sono riportati i valori medi di ampiezza della fase lenta del movimento saccadico. La differenza tra i valori non è significativa confrontando le ampiezze dei movimenti saccadici effettuati durante la fase di stimolazione e durante la fase a coerenza 0 [coerenza 0.2 vs coerenza 0 ($U=474.0$, $p=0.488$), coerenza 0.4 vs coerenza 0 ($U=470.0$, $p=0.456$), coerenza 0.6 vs coerenza 0 ($U=529.0$, $p=1.0$), coerenza 0.8 vs coerenza 0 ($U=531.0$, $p=0.866$), coerenza 1.0 vs coerenza 0 ($U=553.0$, $p=0.650$)]. Non sono significative le ampiezza tra i vari livelli di coerenza [coerenza 0.2 vs coerenza 0.4 ($U=1075.0$, $p=0.897$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.2 ($U=1166.0$, $p=0.401$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.2 ($U=1160.0$, $p=0.323$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.2 ($U=1197.0$, $p=0.120$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.4 ($U=1157.0$, $p=0.441$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.4 ($U=1160.0$, $p=0.323$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.4 ($U=1217.0$, $p=0.150$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.6 ($U=1072.0$, $p=0.772$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.6 ($U=1109.0$, $p=0.560$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.8 ($U=1062.0$, $p=0.692$)].

Non vi è nessuna differenza significativa nemmeno considerando la direzione dello stimolo (coerenza 0.2 ($U=239.0$, $p=0.583$), coerenza 0.4 ($U=263.0$, $p=0.982$), coerenza 0.6 ($U=270.0$, $p=0.912$), coerenza 0.8 ($U=237.0$, $p=0.725$), coerenza 1.0 ($U=197.0$, $p=0.208$)).

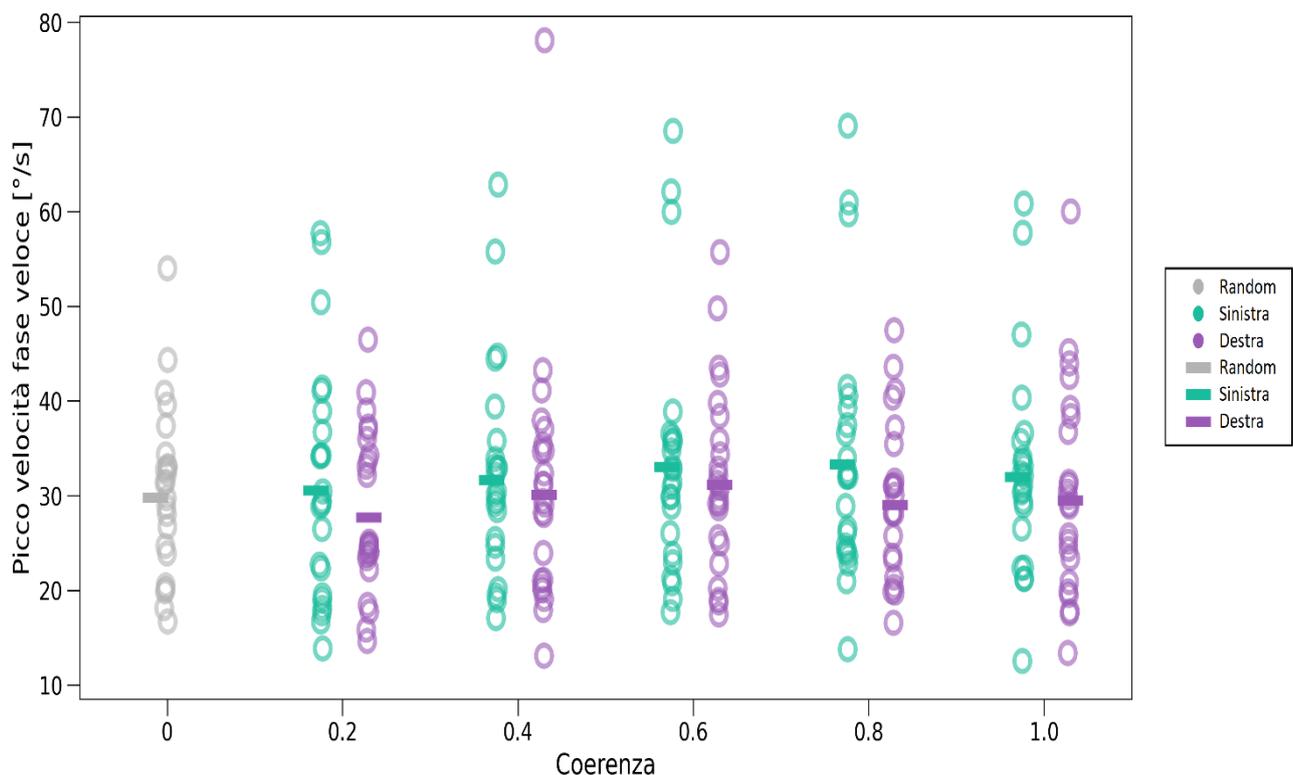


Figura 34. In questo grafico viene riportata sulle ascisse la coerenza dello stimolo, mentre sull'asse delle ordinate viene riportato il picco della velocità della fase veloce saccadica, espresso in %.

Nella Figura 34 sono riportati i valori di velocità massima durante la fase veloce del movimento saccadico. La differenza tra i valori non è significativa confrontando le ampiezze dei movimenti saccadici effettuati durante la fase di stimolazione e durante la fase a coerenza 0 [coerenza 0.2 vs coerenza 0 ($U=500.0$, $p=0.716$), coerenza 0.4 vs coerenza 0 ($U=536.0$, $p=0.934$), coerenza 0.6 vs coerenza 0 ($U=573.0$, $p=0.579$), coerenza 0.8 vs coerenza 0 ($U=528.0$, $p=0.896$), coerenza 1.0 vs coerenza 0 ($U=524.0$, $p=0.938$)]. La differenza tra i valori non è significativa prendendo in considerazione i vari livelli di coerenza [coerenza 0.2 vs coerenza 0.4 ($U=1130.0$, $p=0.577$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.2 ($U=1201.0$, $p=0.266$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.2 ($U=1136.0$, $p=0.425$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.2 ($U=1111.0$, $p=0.549$), coerenza 0.6 vs coerenza 0.4 ($U=1134.0$, $p=0.555$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.4 ($U=1055.0$, $p=0.877$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.4 ($U=1047.0$, $p=0.927$), coerenza 0.8 vs coerenza 0.6 ($U=994.0$, $p=0.748$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.6 ($U=980.0$, $p=0.665$), coerenza 1.0 vs coerenza 0.8 ($U=996.0$, $p=0.897$)]. Non vi è nessuna differenza significativa nemmeno considerando la direzione dello stimolo [coerenza 0.2 ($U=240.0$, $p=0.598$), coerenza 0.4 ($U=239.0$, $p=0.582$), coerenza 0.6 ($U=247.0$, $p=0.708$), coerenza 0.8 ($U=205.0$, $p=0.280$), coerenza 1.0 ($U=210.0$, $p=0.334$)].

6.2 SEZIONE 2

In questa sezione si è andato ad analizzare se la direzione dello stimolo, insieme alla coerenza, influisca sul comportamento delle flies. Nei risultati che seguono i valori non saranno assoluti, ma potranno essere negativi o positivi, indicanti rispettivamente i movimenti effettuati verso sinistra e verso destra.

Nella Figura 35 sono riportati i valori di ampiezza media durante la fase veloce del movimento saccadico in relazione solo alla direzione dello stimolo. È emerso che la direzionalità dello stimolo provoca risposte comportamentali significativamente diverse (destra vs sinistra, $U=108.0$, $p<0.001$), tuttavia confrontando le direzioni dello stimolo con la situazione a coerenza 0 (quindi senza direzione), la differenza è significativa solamente quando lo stimolo si muove verso sinistra ($U=358.0$, $p=0.04$). La mancata significatività quando lo stimolo si muove verso destra ($U=180.0$, $p=0.06$) potrebbe essere dovuta ad una preferenza riscontrata nei confronti dei movimenti verso destra che riduce la differenza nella distribuzione dei valori.

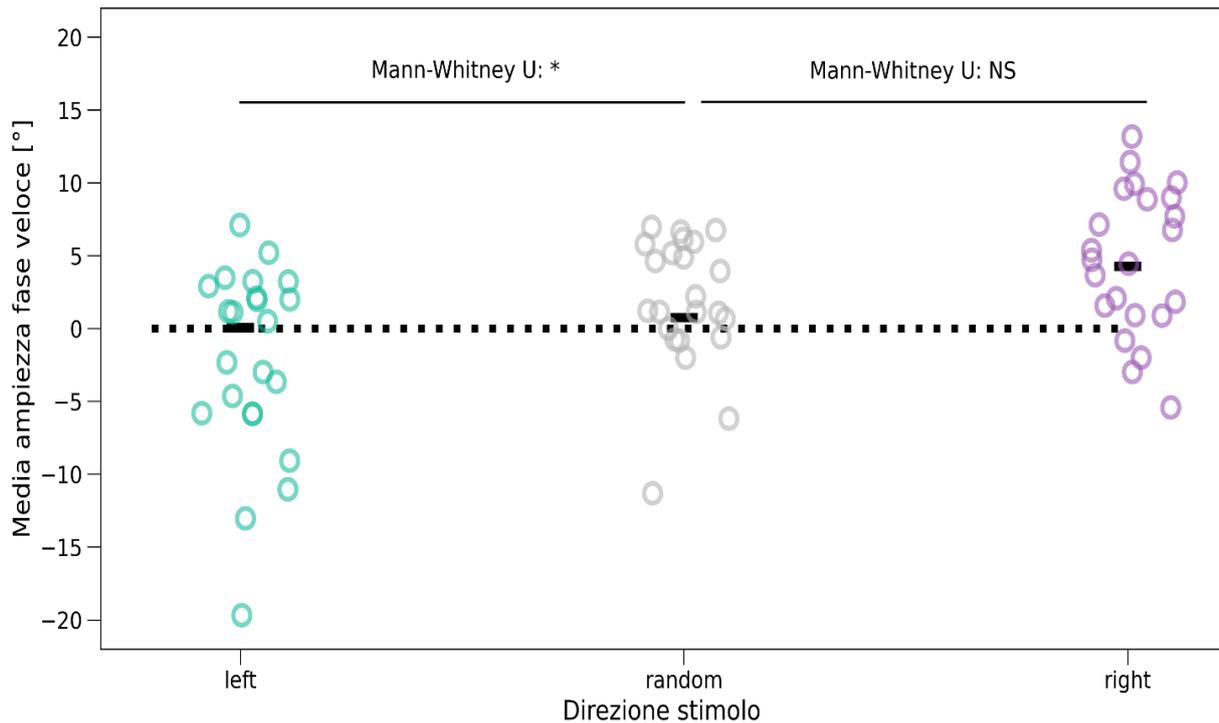


Figura 35. Nel grafico, sull'asse delle ascisse è riportata la direzione dello stimolo visivo, rispettivamente a sinistra, casuale e a destra, mentre sull'asse delle ordinate è riportato il valore medio dell'ampiezza della fase veloce espresso in °. Un valore negativo indica che l'angolo di ampiezza è stato registrato con un movimento verso sinistra, mentre un valore positivo è relativo a un angolo con ampiezza verso destra.

Vista la differenza significativa tra i comportamenti effettuati nelle due direzionalità dello stimolo, si è voluto ampliare l'analisi scomponendo i dati riportati nella Figura 35 per i livelli di coerenza.

I risultati sono riportati in Figura 36. È emerso che a bassi livelli di coerenza non vi sono differenze significative [coerenza 0.2 destra vs sinistra ($U=213.0$, $p=0.262$), coerenza 0.4 destra vs sinistra ($U=209.0$, $p=0.227$)], mentre a livello di coerenza maggiori la differenza è significativa [coerenza 0.6 destra vs sinistra ($U=157.0$, $p=0.018$), coerenza 0.8 destra vs sinistra ($U=82.0$, $p<0.001$), coerenza 1.0 destra vs sinistra ($U=121.0$, $p<0.01$)].

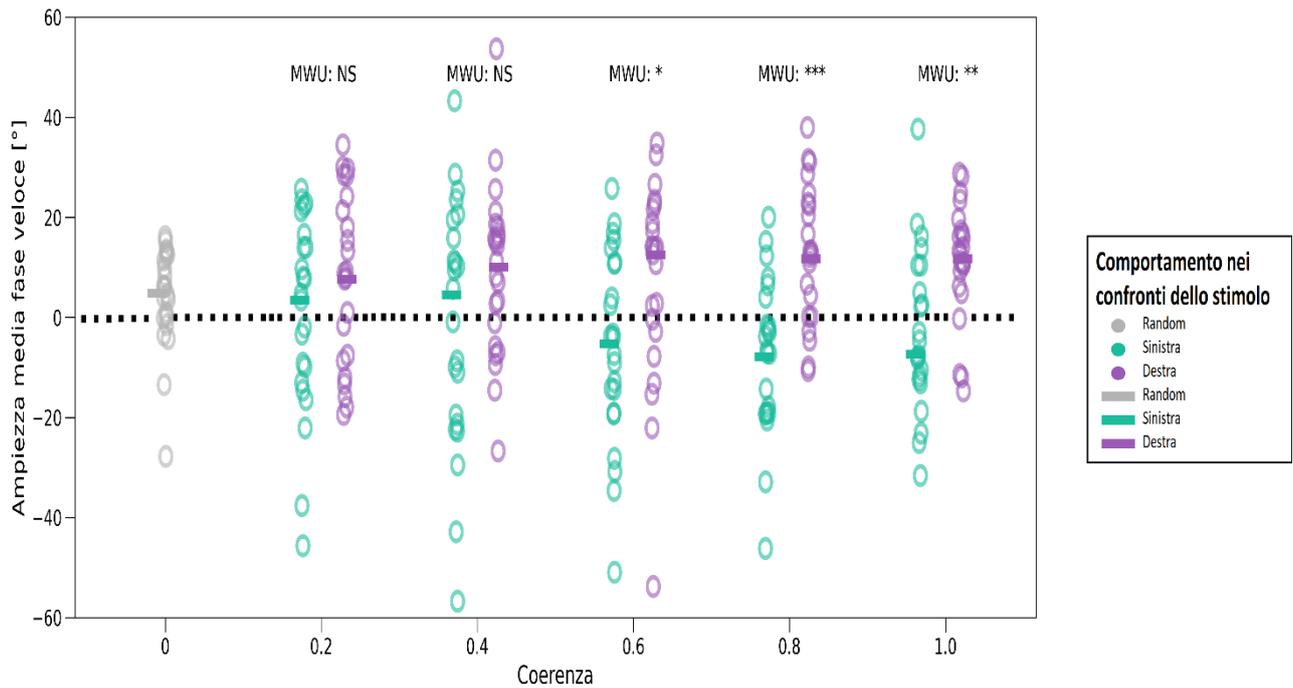


Figura 36. Nel grafico sono riportate le ampiezze medie della fase veloce della saccade in relazione alla coerenza dello stimolo. quindi come varia il comportamento della fly nei confronti degli stimoli presentati. MWU indica il metodo utilizzato, il metodo Mann-Whitney U, mentre gli asterischi * indicano il livello di significatività del test: maggiore è il numero di asterischi, più attendibile sarà il test.

Dalla Figura 36 è emerso come con l'aumentare della coerenza dello stimolo aumenti la risposta delle flies nella direzione dello stimolo. Per completare l'analisi abbiamo calcolato la proporzione dei movimenti corretti effettuati dai soggetti durante la stimolazione. I risultati sono riportati in Figura 34 e si apprezza come, con l'aumento della coerenza, la proporzione di movimenti corretti aumenti.

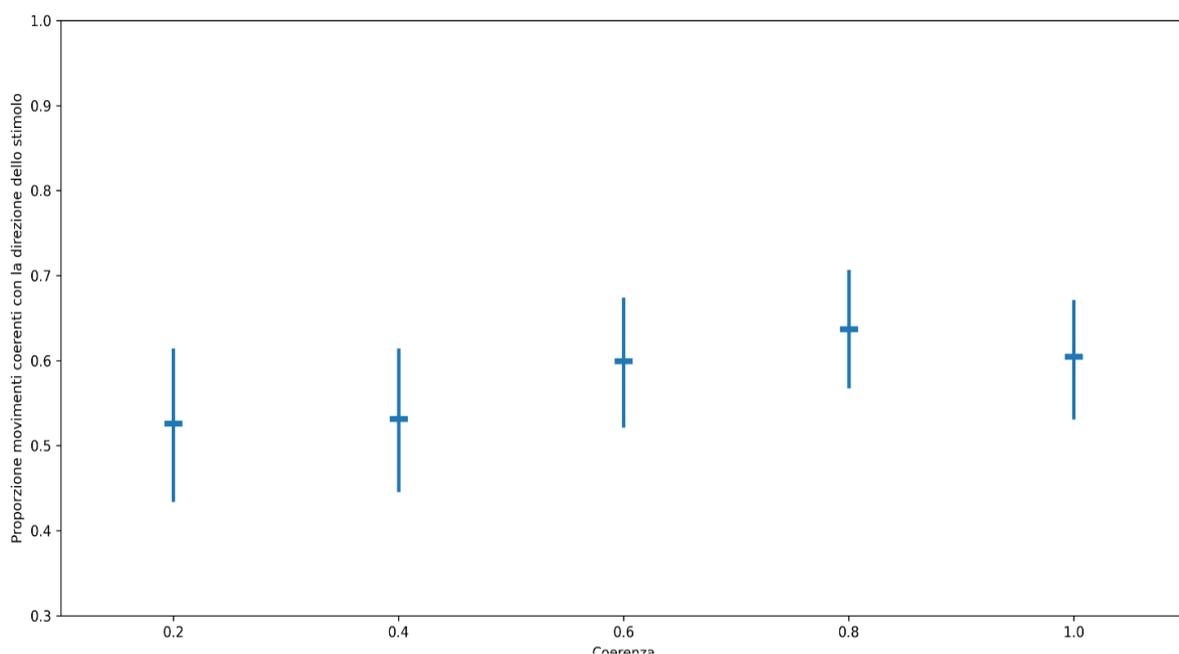


Figura 37. Proporzione di movimenti corretti di *Drosophila* in base allo stimolo presentato.

7. CONCLUSIONI

In questa tesi sperimentale è stata analizzata la risposta visuo-motoria di *Drosophila melanogaster*, in particolare della testa di *Drosophila*, in seguito alla presentazione di uno stimolo visivo di tipo *Random Dots Motion kinematogram (kRDM)*, consistente nella presentazione di una percentuale di *dots* su sfondo bianco in movimento coerente associati a stimoli visivi in movimento casuale. La percentuale di stimoli visivi in movimento coerente è stata differente tra una stimolazione e l'altra: un singolo esperimento è durato circa 30 minuti, all'interno del quale i livelli di coerenza utilizzati andavano da 0,2 (20% dei *dots* coerenti) a 1 (100% di coerenza) tramite intervalli di coerenza di 0,2.

Lo stimolo visivo kRDM è già stato ampiamente utilizzato per comprendere i meccanismi ed i principi alla base della percezione del movimento di un oggetto che viene presentato sulla scena visiva. Grazie a tali esperimenti è stato osservato che, non solo nell'uomo, ma anche in altri mammiferi e in animali inferiori come uccelli, pesci, vertebrati e insetti, tra cui *Drosophila*, il processo di percezione del movimento avviene tramite la fissazione di differenti oggetti visivi, selezionandoli attivamente, mediante un processo saccadico che comporta, nel caso di *Drosophila*, il movimento dell'intero corpo per riorientare la vista sull'oggetto prescelto, dal momento che gli occhi non possono muoversi in modo indipendente dalla testa, come invece accade nell'uomo. Le saccadi corporee del moscerino, come quelle oculari dell'uomo, sono definite come un movimento rapido e simultaneo del corpo (e degli occhi nell'uomo) tra due o più fasi di fissazione visiva nella stessa direzione.

In questo studio sono state analizzate le saccadi corporee prodotte da *Drosophila* durante le stimolazioni di tipo kRDM, soffermandoci per ciò che riguarda il movimento della testa di *Drosophila*. Secondo i vari studi analizzati all'interno della tesi, viene riportato che maggiore è la coerenza dei *dots*, più facile sarà per il soggetto percepire la direzione del movimento dei *dots* coerenti, generando una reazione corporea nei confronti della direzione del movimento percepito. Seguendo questo concetto, si è cercato di stabilire se il movimento saccadico registrato a livello della testa segue il movimento dello stimolo visivo kRDM che viene presentato con varie coerenze, con quanta intensità lo segue, a che livelli di coerenza e con quale ampiezza del movimento saccadico.

Inizialmente, è stato valutato se all'aumentare della coerenza aumenti anche l'ampiezza delle fasi saccadiche lenta e veloce della testa di *Drosophila*: i dati analizzati non hanno evidenziato una correlazione tra i due fattori in tutte le coerenze analizzate, con i valori che si sono attestati quasi sempre negli stessi intervalli all'aumentare della coerenza, pertanto l'ampiezza saccadica non dipende dalla coerenza.

In secondo luogo, come oggetto principale dell'analisi, è stato valutato se la direzione e la coerenza dello stimolo kRDM influenzano in modo generale il comportamento di *Drosophila*, registrando i movimenti saccadici della testa. Quindi, si è cercato di capire *Drosophila* esegue dei movimenti saccadici verso una direzione o l'altra in modo coerente con lo stimolo presentato, se riesce a percepire o meno la direzione dei kRDM, sia quando lo stimolo viene presentato a sinistra che a destra, e se la risposta allo stimolo da parte di *Drosophila* aumenta in modo proporzionale rispetto allo stimolo presentato.

I risultati hanno evidenziato un andamento proporzionale tra l'aumento della coerenza e la percezione dello stimolo visivo da parte di *Drosophila*, pertanto nell'esperimento è stato dimostrato che all'aumentare della percentuale di dots che sono stati presentati verso sinistra o verso destra si ha un aumento anche del grado di percezione di *Drosophila*, che orienta la sua testa e il corpo nei confronti dello stimolo. Questa percezione non sembra esserci a livello di coerenza 0,2 e 0,4 ma diventa evidente dal grado di coerenza 0,6 in poi, con un picco che viene raggiunto a coerenza 0,8.

Questo studio, che in futuro può essere approfondito modificando le caratteristiche dello stimolo visivo, dimostra come in *Drosophila* sia presente un'attività di percezione degli stimoli visivi, che implica la capacità di una loro percezione e distinzione a livello cognitivo all'aumentare del livello di coerenza dello stimolo, sebbene l'ampiezza angolare della risposta saccadica non cambi significativamente.

Questa attività neurofisiologica riscontrata può essere un punto di partenza per la valutazione di altre attività cognitive, sempre mettendo in considerazione animali e specie diverse, a partire dall'uomo fino ad animali inferiori come insetti e invertebrati. La percezione di uno stimolo visivo, quindi, non è una peculiarità dell'uomo, ma è una qualità che si è sviluppata nel corso del tempo e nel corso dell'evoluzione dei sistemi cerebrali passando da organismi più semplici a organismi più complessi. La sfida è cercare di capire se i meccanismi e i principi alla base di queste percezioni sono conservati o meno tra tutti gli essere viventi.

8. BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.humanitas.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso/>.
2. Carbone, E., Aicardi, G. & Maggi, R. *Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati*. (EdiSES Srl).
3. Immagine. <https://terminologiamedica.com/2021/06/28/terminologia-dei-disturbi-neurologici/>.
4. Enciclopedia Treccani. www.treccani.it.
5. Polisenò, A. *L'abitudine, un'utile necessità. Da processo neurofisiologico a processo morale*. (Armando Editore, 2001).
6. Tomassoni, R., Treglia, E. & Lungu, M. A. *Lineamenti di Psicologia Generale*. (2019).
7. Carlson, N. R. *Fisiologia del comportamento*. (Piccin, 2014).
8. Sperling, G. The information available in brief visual presentations. *Psychol. Monogr. Gen. Appl.* **74**, 1–29 (1960).
9. Gargione, G. *Manuale di Psicologia. La teoria neocognitiva*.
10. Anolli, L. & Legrenzi, P. *Psicologia generale*. (Il Mulino, 2012).
11. Immagine. https://www.psicologia.unicampania.it/images/FIT_24_CFU/materiali/PsicologiaGenerale/2018-2019/Gruppo7/Lezione-FIT_2_def.pdf.
12. www.psicologia.unicampania.it.
13. www.wikipedia.com.
14. Zhu, J., Zhang, E. & Rio-Tsonis, K. *Eye Anatomy*. (2012).
15. Immagine. https://www.researchgate.net/publication/277708055_Eye_Anatomy.
16. Treue, S. & Katzner, S. Visual Attention. *Encycl. Neurosci.* (2009).
17. Johnson, S. P. Development of the Visual System. *Neural Circuit Dev. Funct. Healthy Dis. Brain* (2013).
18. Evans, Karla K., Todd S. Horowitz, Piers Howe, Rocco Pedersini, Ester Reijnen, Yair Pinto, Yoana Kuzmova, and Jeremy M. Wolfe. “Visual Attention.” *WIREs Cognitive Science* **2**, no. 5 (2011): 503–14.
19. Posner MI, Snyder CR, Davidson BJ. Attention and the detection of signals.
20. Desimone R, Ungerleider LG. Neural mechanisms of visual processing in monkeys. In: Boller E, Grafman J, eds. *Handbook of Neuropsychology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1990.
21. DeSchepper B, Treisman A. Visual memory for novel shapes: implicit coding without attention.
22. Carrasco, M. How visual spatial attention alters perception. *Cogn. Process.* **19**, (2018).
23. Ickx G, Bleyenheuft Y, Hatem SM. Development of Visuospatial Attention in Typically Developing Children. *Front Psychol.* 2017 Dec 6;8:2064.
24. Sereno, A. B., Babin, S. L., Hood, A. J. & Jeter, C. B. Executive Functions: Eye Movements and Neuropsychiatric Disorders. *Encycl. Neurosci.* 117–122 (2009).
25. Bridgeman, B. Eye Movements. *Encycl. Hum. Behav. Second Ed.* (2012).
26. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Types of Eye Movements and Their Functions.
27. Hejtmančik, J. F., Cabrera, P., Chen, Y., M'Hamdi, O. & Nickerson, J. M. Conn's Translational Neuroscience. in (ed. Conn, P. M. B. T.-C. T. N.) (Academic Press, 2017).
28. *B. Cassin e S. A. Solomon, Dictionary of Eye Terminology, Melvin L. Rubin, M.D. Editor, 1990.*
29. Bruce, C. J. & Friedman, H. R. Eye Movements. in (ed. Ramachandran, V. S. B. T.-E. of the H. B.) 269–297 (Academic Press, 2002).

30. Padoa-Schioppa, C. *Neuroscienze. Basi fisiologiche dei processi decisionali.* (2007).
31. www.oxfordreference.com.
32. Rothenstein, A. L. & Tsotsos, J. K. Selective Tuning: Feature Binding Through Selective Attention BT - Artificial Neural Networks – ICANN 2006. in (eds. Kollias, S., Stafylopatis, A., Duch, W. & Oja, E.) 548–557 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
33. Pilly, P. K. & Seitz, A. R. What a difference a parameter makes: A psychophysical comparison of random dot motion algorithms. *Vision Res.* **49**, 1599–1612 (2009).
34. Immagine. <https://docs.empirica.ly/community-demos/random-dot-motion>.
35. Wattam-Bell, J. Coherence thresholds for discrimination of motion direction in infants. *Vision Res.* (1994).
36. Milne, E. *et al.* High motion coherence thresholds in children with autism. *J. Child Psychol. Psychiatry.* (2002).
37. Snowden, R. J. & Kavanagh, E. Motion Perception in the Ageing Visual System: Minimum Motion, Motion Coherence, and Speed Discrimination Thresholds. *Perception* (2006).
38. Trick, G. L. & Silverman, S. E. Visual sensitivity to motion: age-related changes and deficits in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurology* **41**, 1437–1440 (1991).
39. Tsotsos, J.K., Culhane, S.M., Wai, W.Y.K., Lai, Y.H., Davis, N., Nuflo, F.: Modeling visual-attention via selective tuning. *Artif. Intell.* 78(1-2) (1995) 507–545.
40. Rina, A. *et al.* Visual Motion Coherence Responses in Human Visual Cortex. *Front. Neurosci.* **16**, (2022).
41. Clifford, C. W. G. & Ibbotson, M. R. Fundamental mechanisms of visual motion detection: models, cells and functions. *Prog. Neurobiol.* **68**, 409–437 (2002).
42. Reichardt, W. (1961). Autocorrelation, a principle for the evaluation of sensory information by the central nervous system. In W. A. Rosenblith (Ed.), *Sensory communication* (pp. 303–317).
43. Fried, S. I., Munch, T. A., & Werblin, F. S. (2002). Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature*, 420(6914), 411–414.
44. Douglas, R. M., Neve, A., Quittenbaum, J. P., Alam, N. M. & Prusky, G. T. Perception of visual motion coherence by rats and mice. *Vision Res.* **46**, 2842–2847 (2006).
45. Salzman, C. D., Britten, K. H. & Newsome, W. T. Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. *Nature* **346**, 174–177 (1990).
46. Albright, T. D., Desimone, R. & Gross, C. G. Columnar organization of directionally selective cells in visual area MT of the macaque. *J. Neurophysiol.* **51**, 16–31 (1984).
47. Immagine. <https://neurondynamics.epfl.ch/online/Ch16.S1.html#Ch16.F2>.
48. Roitman, J. D. & Shadlen, M. N. Response of Neurons in the Lateral Intraparietal Area during a Combined Visual Discrimination Reaction Time Task. *J. Neurosci.* **22**, 9475 LP – 9489 (2002).
49. Competing populations and decision making, in *Neuronal Dynamics: From Single Neurons to Networks and Models of Cognition* (eds. Paninski, L., Naud, R., Kistler, W. M. & Gerstner, W.) 421–441 (Cambridge University Press, 2014).
50. Rudolph, K. K. & Pasternak, T. Lesions in Cat Lateral Suprasylvian Cortex Affect the Perception of Complex Motion. *Cereb. Cortex* **6**, 814–822 (1996).
51. Bischof, W., Reid, S., Wylie, D. & Spetch, M. Perception of coherent motion in random dot displays by pigeons and humans. *Percept. Psychophys.* (1999).
52. Bahl, A. & Engert, F. Neural circuits for evidence accumulation and decision making in larval zebrafish. *Nat. Neurosci.* (2020).
53. https://www.itchiavari.org/web/organismo_modello.html.
54. Tolwinski, N. S. Introduction: Drosophila-A Model System for Developmental Biology. *Journal of developmental biology* vol. 5 (2017).

55. Immagine. https://en.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster.
56. Jennings, B. H. Drosophila – a versatile model in biology & medicine. *Mater. Today* **14**, 190–195 (2011).
57. Jeibmann, A. & Paulus, W. Drosophila melanogaster as a model organism of brain diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 407–440 (2009).
58. STALKER, H. D. THE SALIVARY GLAND CHROMOSOMES OF DROSOPHILA NIGROMELANICA. *Genetics* **49**, 883–893 (1964).
59. www.bionity.com.
60. Immagine. https://www.psicoanalisi.it/scienze_biologicalhe/frutta-e-moscerini-il-mondo-di-drosophila-melanogaster/1591/.
61. https://www.academia.edu/43807065/DEVELOPMENTAL_BIOLOGY_PRACTICALS_MANUAL.
62. Immagine. <https://pedrovale.bio.ed.ac.uk/pedrovale/sites/sbsweb2.bio.ed.ac.uk.pedrovale/files/genetics0003.pdf>.
63. Adams, M. D. *et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**, 2185–2195 (2000).
64. Morgan, T. H. & Bridges, C. B. (Calvin B. *Sex-linked inheritance in Drosophila* / by T. H. Morgan and C. B. Bridges. (Carnegie Institution of Washington, 1916).
65. Poulton, J. S. & Deng, W.-M. Cell-cell communication and axis specification in the Drosophila oocyte. *Dev. Biol.* **311**, 1–10 (2007).
66. Yamaguchi, M. & Yoshida, H. Drosophila as a Model Organism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1076**, 1–10 (2018).
67. Immagine. <https://www.biology-pages.info/D/Drosophila.html>.
68. https://bdsc.indiana.edu/stocks/balancers/balancer_intro.html.
69. Benzer, S. From the gene to behavior. *JAMA* **218**, 1015–1022 (1971).
70. Nüsslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* **287**, 795–801 (1980).
71. Wangler, M. F. *et al.* Model Organisms Facilitate Rare Disease Diagnosis and Therapeutic Research. *Genetics* **207**, 9–27 (2017).
72. Freeman, M. R. Drosophila Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
73. Allocca, M. The Fruit Fly, Drosophila melanogaster: Modeling of Human Diseases. in (ed. Zola, S.) Ch. 7 (IntechOpen, 2018).
74. Venken, K. J. T., Simpson, J. H. & Bellen, H. J. Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron* **72**, 202–230 (2011).
75. Kremer, M. C., Jung, C., Batelli, S., Rubin, G. M. & Gaul, U. The glia of the adult Drosophila nervous system. *Glia* **65**, 606–638 (2017).
76. Hanesch, U., Fischbach, K.-F. & Heisenberg, M. Neuronal architecture of the central complex in Drosophila melanogaster. *Cell Tissue Res.* **257**, 343–366 (1989).
77. Guo, A. *et al.* Vision, Memory, and Cognition in Drosophila. in *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (2017).
78. Nichols, C. D. Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* **112**, 677–700 (2006).
79. Crews, S. T. Drosophila Embryonic CNS Development: Neurogenesis, Gliogenesis, Cell Fate, and Differentiation. *Genetics* **213**, 1111–1144 (2019).
80. Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A. W. & Wittbrodt, J. Ciliary Photoreceptors with a Vertebrate-Type Opsin in an Invertebrate Brain. *Science (80-)*. **306**, 869–871 (2004).
81. Takemura, S. Connectome of the fly visual circuitry. *Reprod. Syst. Sex. Disord.* **64**, (2014).

82. Montell, C. Drosophila visual transduction. *Trends Neurosci.* **35**, 356–363 (2012).
83. Rubin, G. M. & Spradling, A. C. Genetic Transformation of Drosophila with Transposable Element Vectors. *Science (80-.)*. **218**, 348–353 (1982).
84. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
85. https://www.treccani.it/enciclopedia/optogenetica_%28Enciclopedia-Italiana%29/.
86. Riemensperger, T., Kittel, R. J. & Fiala, A. Optogenetics in Drosophila Neuroscience. *Methods Mol. Biol.* **1408**, 167–175 (2016).
87. https://bdsc.indiana.edu/stocks/teach/teach_optogenetics.html.
88. Sokolowski, M. B. Drosophila: Genetics meets behaviour. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 879–890 (2001).
89. Cheng, K. Y. & Frye, M. A. Neuromodulation of insect motion vision. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **206**, 125–137 (2020).
90. Ramdya, P. *et al.* Mechanosensory interactions drive collective behaviour in Drosophila. *Nature* **519**, 233–236 (2015).
91. Suzuki, Y. *et al.* Noise-robust recognition of wide-field motion direction and the underlying neural mechanisms in Drosophila melanogaster. *Sci. Rep.* **5**, 10253 (2015).
92. *B. Cassin e S. A. Solomon, Dictionary of Eye Terminology, Melvin L. Rubin, M.D. Editor, 1990.*
93. Mongeau, J.-M. & Frye, M. A. Drosophila Spatiotemporally Integrates Visual Signals to Control Saccades. *Curr. Biol.* **27**, 2901-2914.e2 (2017).
94. Haag, J., Wertz, A. & Borst, A. Central gating of fly optomotor response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20104–20109 (2010).
95. Keleş, M. F. & Frye, M. A. Object-Detecting Neurons in Drosophila. *Curr. Biol.* **27**, 680–687 (2017).
96. Salem, W., Cellini, B., Frye, M. A. & Mongeau, J.-M. Fly eyes are not still: a motion illusion in Drosophila flight supports parallel visual processing. *J. Exp. Biol.* **223**, jeb212316 (2020).
97. Hassenstein, B. & Reichardt, W. Systemtheoretische Analyse der Zeit-, Reihenfolgen- und Vorzeichenauswertung bei der Bewegungspertzeption des Rüsselkäfers Chlorophanus. **11**, 513–524 (1956).
98. Sen, R. *et al.* Moonwalker Descending Neurons Mediate Visually Evoked Retreat in Drosophila. *Curr. Biol.* **27**, 766–771 (2017).
99. Mongeau, J.-M., Cheng, K. Y., Aptekar, J. & Frye, M. A. Visuomotor strategies for object approach and aversion in Drosophila melanogaster. *J. Exp. Biol.* **222**, (2019).
100. Reiser, M. B. & Dickinson, M. H. A modular display system for insect behavioral neuroscience. *J. Neurosci. Methods* **167**, 127–139 (2008).
101. Bender, J. A. & Dickinson, M. H. Visual stimulation of saccades in magnetically tethered Drosophila. *J. Exp. Biol.* **209**, 3170–3182 (2006).
102. Mayer, M., Vogtmann, K., Bausenwein, B., Wolf, R. and Heisenberg, M. (1988). Flight control during free yaw turns in Drosophila melanogaster. *J. Comp. Physiol. A* 163,389-399.

9. RINGRAZIAMENTI

L'università ha rappresentato per me un viaggio incredibile, un'avventura emozionante che mi ha aiutato molto a crescere e a maturare, e ciò è stato reso possibile grazie a ogni singolo attimo che ho passato con tutti coloro che ho incontrato. È stato un viaggio che ha abbracciato due città, Catania e Padova, due anime opposte ma complementari, due vite diverse che si sono incrociate in questo cammino.

Innanzitutto, vorrei ringraziare chi ha permesso tutto questo.

Ringrazio il professor Aram Meghigian per avermi coinvolto in questo progetto di tesi. La ringrazio per essere stato sempre disponibile nei miei confronti e per avermi trattato davvero bene in questo periodo, aiutandomi in ogni situazione e in ogni necessità. La ammiro per la sua dedizione nel lavoro e per la sua passione in quello che fa, è stato un onore per me aver incontrato un professore come lei.

Ringrazio tantissimo Matteo, che mi ha introdotto al progetto dai primi istanti e che è sempre stato disponibile per ogni cosa, per aiutarmi in ogni momento di incomprensione e per avermi dato una mano ogni volta che la richiedevo. Grazie ancora per tutto, ti auguro il meglio per il tuo futuro.

Le mie considerazioni successive saranno in ordine un po' sparso, non cronologico, né di importanza, per ricordare tutti coloro che hanno fatto parte della mia vita universitaria o meno, fino a oggi.

Più che ringraziare, inizialmente, vorrei semplicemente ricordare le persone che, purtroppo, non ci sono più.

Marco, è difficile scrivere un pensiero su di te e non mi sento di esserne tanto capace. So solo che in questo giorno vorrei ricordarti col sorriso, perché te lo meriti tu che facevi ballare e divertire tutti, lo stesso sorriso che non abbandona mai il viso di Diego. Se lo vedessi, adesso, saresti fiero di lui, nonostante non stia fermo un attimo... spero che questa vivacità se la porti sempre con sé. Vorrei ringraziare la zia Maria, lo zio Ottavio, Margherita e Sandro, per la forza enorme che hanno e per la vicinanza che hanno sempre avuto nei miei confronti. Sono persone meravigliose e sono fantastici con Diego, con me e con tutti, sono sicuro che lo sai bene da lassù. Non ti dimenticheremo mai. Ciao Marco!

Vorrei ricordare anche i miei nonni, che non ci sono più da tempo, e coi quali ho avuto la fortuna di passare momenti meravigliosi nella mia vita. I miei ricordi sono lontani, relativi a molti anni fa, ma sicuramente non sfocati. Vorrei ricordare principalmente mia nonna Rosina, che se ne è andata 3 anni fa e che era la nonna che tutti i nipoti avrebbero voluto avere. Sebbene lei non l'avesse mai esternato, sono sicuro che io fossi il suo nipote preferito, forse perché il più piccolo di tutti. Nonna, vorrei chiederti scusa per il fatto che da piccolo non mangiavo nulla... una grande cuoca come te era sicuramente spreca nel cucinare per me quando tornavo da scuola! Il tuo sguardo d'amore nei miei confronti non lo dimenticherò mai. Ciao nonna!

Voglio ringraziare la mia famiglia per tutto quanto.

Ringrazio i miei genitori che non mi hanno fatto mai mancare nulla. Mamma, papà, avete sempre assecondato ogni mia scelta, che fosse quella di restare o di andarmene via, non avete mai dubitato di me e in me avete creduto sempre probabilmente più di quanto ci creda io adesso. L'affetto che provo nei vostri confronti non è facile da esternare per me e non lo è mai stato, sicuramente per colpa mia,

ma sappiate che non ho mai dubitato un singolo istante del vostro amore e che non basterà una vita intera a ricompensarvi di tutto ciò che avete fatto per me, figuriamoci una laurea. Andando via ho compreso molto di più l'importanza della vostra presenza, che prima davo per scontata, ma che adesso comprendo bene che abbia un valore enorme e che porterò sempre con me, ovunque andrò. Vi ringrazio per ogni sacrificio.

Ringrazio mio fratello Gae, con il quale caratterialmente penso di avere poco o nulla in comune, ma che sono sicuro mi voglia un bene dell'anima come io voglio bene a lui. Lo ringrazio per tutti i momenti che abbiamo vissuto insieme giù, per tutto quello che ha fatto per me e per il supporto che mi ha sempre dato. Lo ringrazio un po' meno per la musica che mi faceva ascoltare in camera quando ero piccolo, e anche per la squadra che tifa... "ma un fratello maggiore non ha sempre ragione, solo qualche anno in più".

Ringrazio tutta la restante parte della mia famiglia, tutti i miei zii, cugini e parenti, in particolare mio cugino Giulio, con il quale sono cresciuto tutta la mia vita e che ho sempre reputato un fratello maggiore per me.

Ringrazio tutte le persone con cui sono cresciuto ad Augusta.

Vorrei partire ringraziando i miei vecchi compagni di classe coi quali sono ancora legato e dei quali potrei dire miliardi di cose, cioè Marco, Dario, Lorenzo, Daniele, Simone, Tiziano, e gli altri ragazzi del gruppo del "Sinedrio". Grazie per tutto quello che abbiamo vissuto insieme, dal 2010 in poi. Per ogni gita, ogni campo, ogni viaggio, ogni serata, ogni avventura.

Vorrei ringraziare i ragazzi della mia vecchia comitiva, coi quali ho avuto momenti indimenticabili, tra capodanni indelebili, serate passate a giocare e un'intera discografia che ci riguarda. Umberto, Emiliano, Eugenio, Giulio, Mirko, Matteo, Federico, Daniele. Grazie per tutto quanto.

Non se la prendano gli altri, a cui voglio un bene dell'anima, ma vorrei ringraziare in particolar modo l'unico che ha fatto parte di entrambi i gruppi precedenti: Umberto. Ti ringrazio perché ti conosco dai tempi delle medie e sei la persona a me totalmente opposta e del quale certe volte capisco veramente poco, ma nonostante questo ci siamo sempre stati vicini in tutto e abbiamo un'amicizia incredibile che non cambierei mai. Grazie perché in ogni storia, in ogni situazione, quasi come per magia c'è sempre la tua presenza.

Vorrei ringraziare Catania, che mi ha fatto provare le mie prime esperienze di vita universitaria, e che mi ha dato davvero tanto, tra gioie e dolori. Ringrazio i colleghi che ho avuto lì, il gruppo di persone con cui uscivo e che mi ha fatto passare 3 anni indimenticabili. Tra tutti ringrazio Giuseppe, Sebastiano e Carmelo (strano chiamarvi così), coi quali sono rimasto più in contatto nonostante la lontananza. Grazie per tutti i momenti trascorsi.

Ringrazio tantissimo Padova, che mi ha accolto senza che io sapessi qualcosa di lei, della sua anima piena di nebbia e umidità. A Padova ho chiesto soltanto di non deludermi, appena arrivato, e lei non l'ha fatto. Qui ho intrapreso un cambiamento incredibile e penso di esser maturato tanto, sentendomi più libero di essere me stesso e di prendere in mano la mia vita. Non ti dimenticherò mai.

Ringrazio Antonio e Morgana. Assieme, Antonio prima e io con Morgana dopo, abbiamo intrapreso il viaggio Catania – Padova.

Ringrazio Antonio per ogni aiuto che mi ha sempre dato, ad Augusta, a Catania e a Padova, per essere stato sempre un buon amico con me e per essere stato sempre disponibile, trattandomi quasi come un fratellino. Per le volte in cui abbiamo mangiato insieme senza che io potessi cucinare qualcosa, per tutte le partite a calcio e per tutti i consigli. Se tu non fossi andato via un anno prima non so come sarebbe la mia vita adesso. Ti ringrazio perché hai cambiato la mia vita, forse senza volerlo, ma hai fatto tantissimo.

Ringrazio Morgana per essere l'unica persona, l'unica collega e amica, con cui ho avuto il piacere di passare tutti i miei anni universitari. Questi anni non sono stati facili, dall'inizio a Catania al trasferimento a Padova, ma è stato bello avere un'amica su cui contare in ogni situazione. Non so se da solo sarei stato capace di intraprendere questo viaggio, sicuramente avrei avuto più difficoltà. Grazie per tutto.

Ringrazio tutti i coinquilini che ho avuto in questi anni, che mi hanno regalato grandi momenti di spensieratezza e di felicità, dei quali ce n'è sempre bisogno all'università. Ringrazio Alberto, che per me è come un fratello e con il quale ho passato magnificamente i miei primi 2 anni a Catania. Ne ho avuti tantissimi, ma vorrei ringraziare particolarmente Dario, Salvatore, Jacopo ed Eugenio, per ciò che ognuno di voi mi ha dato in questi anni a Padova. Avete tutti contribuito ad arricchire le mie esperienze di vita e non dimenticherò i momenti che ho passato con voi.

Ringrazio i ragazzi del gruppo HC, che negli ultimi anni mi hanno tenuto compagnia in qualsiasi momento. Tifare Inter probabilmente è una sfortuna, ma sono felice di dividerla con voi.

Il mio ultimo ringraziamento, non il meno importante, va a una persona speciale. A Vale, che ha illuminato la mia vita dal primo momento in cui l'ho vista, e senza la quale poco di tutto questo sarebbe stato possibile. Magari penserai che non hai fatto niente, che non meriti tutto questo, ma la tua presenza è sempre stata la ragione più forte per continuare. Ho avuto molti alti e bassi, molte volte ho pensato che non avrei mai portato a termine tutto questo, ma averti accanto è stato fondamentale per farmi andare avanti e farmi credere in me stesso. Grazie per avermi cambiato la vita, per avermi preso per mano e per aver reso più dolce l'università che spesso, troppe volte, è fortemente amara. Grazie per avermi fatto amare il Veneto, per aver viaggiato ovunque insieme a me e per volerlo fare ancora e ancora, senza fine. Potrei scrivere tantissime cose su di te, una tesi, un libro o magari una collana intera, potrei ringraziarti per tutti gli infiniti attimi che abbiamo vissuto insieme, ma comunque non riuscirei a esprimere tutto quello che sento. D'ora in poi inizierà un'altra nostra vita, lontana dai luoghi in cui ci siamo conosciuti: a me non importa dove, né cosa succederà, l'unico augurio che faccio a me stesso è quello di averti accanto felice e di amarti ogni istante, perché meriti che ogni singolo attimo sia vissuto con gioia e luce negli occhi. Grazie di esistere, grazie per tutto.