

## RUOLO DEL VERME CEREBELLARE NELLA ABITUDINE A LUNGO TERMINE DELLA ACOUSTIC STARTLE RESPONSE NEL RATTO \*

L. LOPIANO, C. DE' SPERATI e M. BERGUI

Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana, Università degli Studi, Torino

**Riassunto.** - La lesione del verme cerebellare, effettuata prima dell'addestramento, impedisce l'instaurarsi dell'abitudine a lungo termine della acoustic startle response del ratto senza interferire con l'abitudine a breve termine. Per verificare il ruolo del cervelletto nelle fasi di acquisizione e ritenzione dell'abitudine a lungo termine, abbiamo eseguito la vermectomia dopo l'addestramento. Cinque giorni dopo la lesione è stato misurato il grado di ritenzione del comportamento appreso: il valore ottenuto era simile a quello degli animali di controllo sottoposti allo stesso addestramento. Per escludere aspetti aspecifici della lesione sull'ampiezza della risposta abbiamo utilizzato un altro gruppo di animali sottoposti alla vermectomia ma non all'addestramento. La risposta ottenuta cinque giorni dopo la lesione non presentava differenze significative rispetto a quella ottenuta prima della lesione. I nostri risultati portano a concludere che il cervelletto è essenziale nella fase di acquisizione ma non nella ritenzione dell'abitudine a lungo termine della startle response.

**Summary** (Role of the cerebellar vermis in the long-term habituation of the acoustic startle response in the rat). - Removal of the cerebellar vermis before training, remarkably attenuates long-term habituation of acoustic startle response of the rat, without interfering with short-term habituation. In order to determine which phase of the learning process (acquisition and retention) is under cerebellar control, the cerebellar vermis was lesioned following the habituation training. Five days after surgery the retention test showed a decreased response not statistically different from that observed in intact rats, habituated with the same training. In order to exclude non specific effects of the surgical lesion on the response, a third group of rats was subjected to the same surgical procedure, but not to training. In these animals, the response was not significantly different from that obtained before surgery. Our results indicate that the cerebellar vermis is essential for the acquisition and it is not required for the retention of long-term habituation of the startle response.

### Introduzione

L'abitudine viene definita come la diminuzione dell'intensità di una risposta comportamentale che si riscontra quando uno stimolo inizialmente nuovo viene presentato ripetutamente [1]. Esistono due forme di abitudine: a breve termine, che dura per qualche minuto, e a lungo termine, che persiste per giorni o settimane. Come ogni altro processo di apprendimento, l'abitudine consta di una fase di acquisizione, che avviene durante l'addestramento, ed una fase di ritenzione, definita come il tempo di persistenza della modificazione comportamentale.

Uno dei modelli più utilizzati per studiare i meccanismi neuronali dell'abitudine nei vertebrati è la *acoustic startle response* del ratto, una reazione di sobbalzo provocata da un appropriato stimolo acustico. Il circuito nervoso responsabile della risposta è localizzato nella parte caudale del tronco cerebrale ed è ben conosciuto [2].

E' stato recentemente dimostrato che la parziale ablazione del verme cerebellare prima dell'addestramento impedisce la formazione dell'abitudine a lungo termine della *startle response* senza interferire con il riflesso e con l'abitudine a breve termine [3]. In questi esperimenti non era possibile determinare se il cervelletto induce in altre strutture nervose le modificazioni plastiche, oppure se queste avvengono nel cervelletto stesso. Per affrontare questo problema, che riguarda non solo i meccanismi dell'abitudine, ma anche il ruolo che il cervelletto svolge nell'apprendimento motorio [4, 5] abbiamo eseguito la lesione dopo l'addestramento degli animali: nel caso che il sito plastico si trovasse nel verme cerebellare, la lesione dovrebbe provocare la perdita del comportamento appreso.

### Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 3 gruppi di ratti albini: il gruppo di controllo (17 ratti) sottoposto solo all'addestramento, il gruppo sperimentale (12 ratti) sottoposto sia all'adde-

\* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

stramento che alla successiva vermectomia e un terzo gruppo (8 ratti) sottoposto alla sola vermectomia. Quest'ultimo gruppo è servito per escludere la presenza di effetti aspecifici della lesione.

L'analisi comportamentale veniva effettuata in una speciale gabbia dotata di un accelerometro sensibile al movimento *whole body* del ratto; il segnale veniva rettificato ed inviato ad un computer per l'acquisizione *on-line* dei dati. È stata registrata la risposta che si verifica nei primi 60 ms dallo stimolo e misurato il picco più alto.

Lo stimolo acustico da noi utilizzato aveva un'intensità di 104 dB su un rumore di fondo di 72 dB e una durata di 1 s. L'addestramento durava 9 giorni e consisteva in 2 fasi: per i primi 6 giorni gli animali hanno ricevuto 3 stimoli al giorno separati da un intervallo di un'ora e, nei tre giorni successivi, 18 stimoli con un intervallo di 20 s. In decima giornata il gruppo sperimentale è stato sottoposto a vermectomia. In quindicesima e sedicesima giornata gli animali sono stati nuovamente stimolati per valutare il grado di ritenzione. Negli animali lesi è stata inoltre verificata la presenza dell'abitudine a breve termine (1 sessione; 18 stimoli separati da un intervallo di 20 s). I test statistici utilizzati sono l'analisi della varianza e il test *t* di Student.

Il terzo gruppo di animali ha ricevuto uno stimolo, dopo una settimana è stato sottoposto alla lesione e cinque giorni dopo ha ricevuto un secondo stimolo.

La vermectomia è stata eseguita mediante aspirazione e l'ablazione ha interessato un'area del verme cerebellare che va dal terzo all'ottavo lobulo.

## Risultati

La parte A della Fig. 1 rappresenta l'andamento della risposta nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale; sono rappresentati i valori della risposta durante i primi 6 giorni di addestramento. Non sono stati rappresentati i valori dei giorni successivi perché, dopo il sesto giorno, non si verificano ulteriori modificazioni significative. Ciascun punto rappresenta la media delle prime risposte di ogni giorno di tutti gli animali.

Si può osservare come l'addestramento induca una notevole diminuzione dell'ampiezza della risposta: il valore del sesto giorno è solo il 43% di quello iniziale nei gruppi di controllo ( $t(16) = 2,3; p > 0,02$ ), il 36% nel gruppo sperimentale ( $t(11) = 3,0; p < 0,001$ ). L'analisi della varianza dimostra che il valore medio della risposta diminuisce significativamente lungo i giorni sia nel gruppo di controllo ( $F(5,96) = 7,9; p < 0,001$ ) che nel gruppo sperimentale ( $F(5,66) = 8,8; p < 0,001$ ).

La linea tratteggiata rappresenta il valore della risposta ottenuto nel gruppo sottoposto alla sola vermectomia; questo valore si riferisce alla stimolazione effettuata prima della lesione. Il livello di risposta di questi

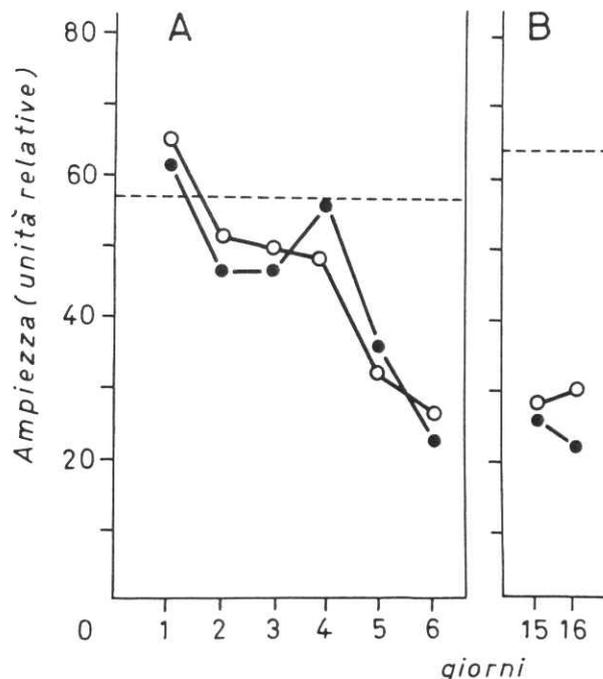


Fig. 1. - A: Acquisizione. Sono rappresentati i valori della risposta durante i primi 6 giorni di addestramento, nel gruppo di controllo (○—○) e nel gruppo sperimentale (●—●). Ciascun punto è stato ottenuto calcolando la media delle prime risposte di ogni giorno. La linea tratteggiata rappresenta il valore della risposta ottenuto prima della lesione nel gruppo sottoposto alla sola vermectomia. B: Ritenzione. In questa parte della figura sono illustrati i valori del test di ritenzione nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale. Gli animali hanno ricevuto uno stimolo al giorno per 2 giorni. La linea tratteggiata si riferisce alla risposta ottenuta 5 giorni dopo la lesione nel gruppo sottoposto solo a vermectomia.

animali non è statisticamente differente dal valore del primo giorno degli altri due gruppi.

Nella parte B sono rappresentati i valori della risposta del gruppo di controllo e del gruppo sperimentale al momento del test di ritenzione. Si può osservare che il comportamento dei due gruppi è identico: la differenza tra i valori del quindicesimo giorno non è statisticamente significativa ( $t(27) = 0,2; p > 0,7$ ). Nei due gruppi, la differenza del valore del quindicesimo giorno con quello del sesto giorno non è statisticamente significativa; è invece significativa la differenza tra la risposta del quindicesimo giorno e quella del primo giorno, sia nel gruppo di controllo ( $t(16) = 2,4; p < 0,02$ ) che nel gruppo sperimentale ( $t(11) = 2,2; p < 0,05$ ).

La linea tratteggiata si riferisce alla risposta ottenuta 5 giorni dopo la lesione nel gruppo sottoposto solo a vermectomia; questo valore non è statisticamente differente rispetto a quello ottenuto prima della lesione ( $t(7) = 0,9; p > 0,7$ ). La vermectomia non determina quindi una diminuzione aspecifica della risposta. Il gruppo sperimentale, dopo il test di ritenzione, è stato inoltre sottoposto ad una sessione di abitudine a breve termine. Il confronto statistico con la sessione nel nono giorno di

addestramento dimostra che la lesione non interferisce con il fenomeno dell'abitudine a breve termine: l'ampiezza della risposta diminuisce significativamente anche dopo la lesione ( $F(17,374) = 3,28; p < 0,001$ ).

## Discussione

I risultati da noi ottenuti confermano che la lesione del verme cerebellare non interferisce con la risposta riflessa e con i meccanismi neuronali dell'abitudine a breve termine [3]. I nostri esperimenti, alla luce dei risultati ottenuti da Leaton e Supple [3], dimostrano che il verme cerebellare è essenziale solo per la fase di acquisizione dell'abitudine a lungo termine; la vermectomia eseguita dopo l'addestramento non interferisce con la ritenzione del comportamento appreso.

Uno dei problemi più dibattuti della fisiologia cerebellare è quello della memoria motoria. È stato ipotizzato [4, 5] che la corteccia cerebellare sia la sede dei fenomeni plastici che avvengono durante l'apprendimento motorio e durante i processi di recupero funzionale dopo una lesione del sistema nervoso centrale. Secondo questo modello l'attivazione contemporanea delle fibre rampicanti e delle fibre muscolari, le due principali afferenze del cervelletto, indurrebbe una riduzione della

trasmissione sinaptica a livello delle sinapsi tra fibre parallele e cellule di Purkinje.

Sono stati recentemente utilizzati diversi modelli sperimentali per verificare questa ipotesi, ma i risultati ottenuti non hanno ancora portato a conclusioni definitive. La corteccia cerebellare potrebbe avere un ruolo essenziale nei fenomeni plastici del riflesso vestibolo-oculare [6], mentre nel riflesso condizionato di ammicciamento non sembra essere essenziale per la ritenzione della risposta condizionata [7].

I nostri risultati dimostrano che, nell'abitudine a lungo termine della *startle response*, il verme cerebellare non è la sede delle modificazioni plastiche e che le due fasi del processo di apprendimento, la fase di acquisizione a quella di ritenzione, possono essere dissociate. Una struttura essenziale per l'acquisizione può non svolgere un ruolo critico nella ritenzione della modificazione comportamentale indotta dall'apprendimento. Si può ipotizzare che le modificazioni plastiche a lungo termine avvengano nel circuito che media la risposta riflessa. Il cervelletto, come struttura inibitoria estrinseca, potrebbe essere essenziale durante la fase di acquisizione per indurre nel circuito le modificazioni funzionali responsabili dell'abitudine a lungo termine della *startle response*.

Ricevuto il 25 febbraio 1988.

Accettato il 22 marzo 1988.

## BIBLIOGRAFIA

1. HARRIS, J.D. 1943. Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychol. Bull.* **40**: 385-422.
2. DAVIS, M., GENDELMAN, D.S., TISCHLER, M.D. & GENDELMAN, P.M. 1982. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J. Neurosci.* **2**: 791-805.
3. LEATON, R.N. & SUPPLE, W.F. Jr. 1986. Cerebellar vermis: essential for long-term habituation of the acoustic startle response. *Science* **232**: 513-515.
4. MARR, D.A. 1969. A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol. (London)* **202**: 437-470.
5. ALBUS, J.S. 1971. A theory of cerebellar function. *Math. Biosci.* **10**: 25-61.
6. ITO, M. 1984. *The cerebellum and neural control*. Raven Press, New York.
7. LAVOND, D.G., STEINMETZ, J.E., YOKAITIS, M.H. & THOMPSON, R.F. 1987. Reacquisition of classical conditioning after removal of cerebellar cortex. *Exp. Brain Res.* **67**: 569-593.