

Giulia Paparella

Correlati neurofisiologici della bradicinesia nella Malattia di Parkinson

Giulia Paparella¹ in collaborazione con Matteo Bologna¹⁻², Andrea Guerra¹, Laura Giordo¹, Danilo Alunni Fegatelli³, Anna Rita Vestri³, John C. Rothwell⁴ and Alfredo Berardelli.

1Department Human Neurosciences, Sapienza University of Rome, Italy

2Neuromed Institute IRCCS, Pozzilli (IS), Italy

3Department of Public Health and Infectious Disease, Sapienza University of Rome, Italy

4Sobell Department of Motor Neuroscience and Movement Disorders, University College London (UCL), Institute of Neurology, London, United Kingdom

ABSTRACT

Studi neurofisiologici hanno identificato diverse alterazioni a livello della corteccia motoria primaria in pazienti affetti da Malattia di Parkinson. Non è chiaro, tuttavia, se esiste una relazione tra queste alterazioni neurofisiologiche e la bradicinesia, uno dei sintomi cardine della malattia. Lo scopo del presente studio è quello di individuare possibili relazioni tra le misurazioni oggettive della bradicinesia e le alterazioni neurofisiologiche della corteccia motoria primaria, testate attraverso tecniche di stimolazione magnetica transcranica. Sono stati arruolati 22 pazienti con Malattia di Parkinson e 18 soggetti sani. Le caratteristiche (ampiezza, velocità e decremento) dei movimenti ripetuti di apertura e chiusura delle prime due dita della mano (*finger tapping*) sono state analizzate mediante un sistema di analisi cinematica. L'eccitabilità della corteccia motoria primaria è stata misurata registrando la curva di reclutamento (stimolo-risposta) dei potenziali evocati motori. L'inibizione e la facilitazione intracorticale della corteccia motoria primaria sono state valutate mediante un paradigma condizionante-test (doppio stimolo). La plasticità dell'area motoria primaria è stata infine valutata utilizzando un protocollo di stimolazione associativa. I pazienti sono stati testati senza e con terapia. Al fine di evidenziare eventuali relazioni tra parametri cinematici e neurofisiologici abbiamo effettuato un'analisi di correlazione canonica. I pazienti con Malattia di Parkinson effettuavano un movimento ripetuto delle dita più lento, meno ampio e caratterizzato da un maggior decremento di ampiezza durante la ripetizione rispetto ai controlli. Inoltre, i pazienti presentavano una curva di reclutamento stimolo-risposta dei potenziali evocati motori più ripida, ed una risposta ridotta al protocollo di plasticità rispetto ai soggetti sani. Nel gruppo dei pazienti, le misure di bradicinesia correlavano con la ripidità della curva stimolo-risposta e con gli effetti indotti dal protocollo di plasticità. Anche se la terapia dopaminergica migliorava le variabili cinematiche neurofisiologiche, non abbiamo trovato correlazione tra queste. In conclusione, le alterazioni neurofisiologiche della corteccia motoria primaria correlano con la bradicinesia nella Malattia di Parkinson, anche se altri meccanismi sensibili al livello dopaminergico svolgono un ruolo.

INTRODUZIONE

La bradicinesia, o la lentezza del movimento, è una dei sintomi cardine della Malattia di Parkinson (MP) (Berardelli et al., 2013; Postuma et al., 2015). Il termine bradicinesia viene comunemente utilizzato in maniera estensiva per indicare, oltre che la ridotta velocità, anche altre alterazioni del movimento volontario, ovvero la riduzione in ampiezza (ipocinesia) ed la progressiva riduzione dell'ampiezza e della velocità (decremento) durante i movimenti ripetitivi (Agostino et al., 1992 e 2003; Berardelli et al., 2001; Espay et al., 2009 e 2011; Kang et al., 2010; Heldman et al., 2014; Bologna et al., 2016a; Hasan et al., 2017). Si ritiene che la bradicinesia dipenda principalmente dalla disfunzione dei gangli della base e da un secondario coinvolgimento della corteccia motoria primaria - M1 (Berardelli et al., 2001). Studi effettuati in modelli sperimentali animali hanno dimostrato che le alterazioni neurofisiologiche di M1 potrebbero contribuire alla fisiopatologia della bradicinesia (Xu et al., 2017; Pasquereau et al., 2011 e 2016). Tuttavia, il ruolo fisiopatologico di M1 nei pazienti non è ad oggi del tutto chiaro. Studi neurofisiologici effettuati in pazienti affetti da MP mediante le tecniche di stimolazione magnetica transcranica (TMS) hanno dimostrato diverse alterazioni di M1, ovvero un incremento abnorme dell'eccitabilità corticospinale, una ridotta inibizione intracorticale (Cantello et al., 2002; Currà et al., 2002; Lefaucheur et al., 2005; Berardelli et al., 2008; Bologna et al., 2016b), ed infine una ridotta plasticità a lungo termine (LTP) (Morgante et al., 2006; Ueki et al., 2006; Schwingenschuh et al., 2010; Suppa et al., 2011; Kojovic et al., 2012 e 2015; Kawashima; et al., 2013; Kishore et al., 2017). Alcuni studi hanno riportato una debole relazione tra le modifiche di plasticità di M1 e i punteggi ottenuti nelle scale cliniche, ovvero una maggiore riduzione di plasticità si associava ad una maggior gravità dei sintomi motori (Ueki et al., 2006; Kojovic et al., 2012 e 2015; Kishore et al., 2017). Il presente studio si propone di indagare le possibili relazioni tra le variabili cinematiche del movimento e le alterazioni neurofisiologiche di M1 nei pazienti con MP. Il movimento ripetuto delle dita della mano è stato valutato obiettivamente attraverso tecniche di analisi cinematica. L'eccitabilità e la plasticità di M1 sono state misurate utilizzando varie tecniche di TMS. Per valutare gli effetti del trattamento dopaminergico sulle misure neurofisiologiche, abbiamo valutato i pazienti in due sessioni distinte, senza e con la loro abituale terapia dopaminergica. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un gruppo di soggetti sani.

MATERIALI E METODI

Partecipanti

Ventidue pazienti con MP (4 femmine, età media \pm 1 deviazione standard: $67,2 \pm 10,3$) e 18 controlli sani - CS (6 femmine, età media \pm 1 deviazione standard: $63,0 \pm 11,8$) sono stati arruolati nel studio. La diagnosi di MP era basata su criteri clinici comunemente accettati (Berardelli et al., 2013; Postuma et al., 2015). La valutazione clinica comprendeva la scala Hoehn e Yahr (H & Y) e la sezione motoria (parte III) della della scala di valutazione della MP elaborata dalla Movement Disorder Society (MDS-UPDRS), (Goetz et al., 2008; Antonini et al., 2013). La valutazione clinica comprendeva inoltre la Beck Depression Inventory (BDI), (Beck et al., 1961), il Montreal Cognitive Assessment (MOCA), (Nasreddine et al., 2005), la Frontal Assessment Battery (FAB) (Dubois et al. , 2000) e la Fatigue Severity Scale (FSS) (Friedman et al., 2010). La valutazione clinica è stata eseguita da un esperto in disturbi del movimento. Le procedure sperimentali sono state condotte in accordo ai regolamenti della dichiarazione di Helsinki e alle linee guida internazionali sulla sicurezza (Rossi et al., 2009; Rossini et al., 2015) e sono state approvate dal comitato etico. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto.

Valutazione cinematica

I partecipanti allo studio, seduti comodamente su una sedia, venivano invitati a eseguire movimenti ripetitivi di apertura e chiusura delle prime due dita della mano (*finger tapping*). Abbiamo effettuato tre registrazioni da 15 secondi ciascuna nel lato più affetto nei pazienti e nel lato dominante nei CS. Ai partecipanti è stata concessa una pausa di 45-60 secondi tra una prova e l'altra al fine di evitare

l'affaticamento. Le registrazioni cinematiche sono state eseguite utilizzando un sistema optoelettronico per l'analisi del movimento (SMART, BTS Engineering, Italia), costituito da tre telecamere a infrarossi capaci di seguire lo spostamento nello spazio tridimensionale di marcatori riflettenti posizionati sull'arto superiore (frequenza di campionamento di 120 Hz). I marcatori avevano un diametro di 5 mm ed un peso trascurabile. Abbiamo posizionato due marcatori sulla punta dell'indice e del pollice. Altri tre marcatori sono stati posizionati sulla mano per definire un piano di riferimento utilizzato per escludere possibili contaminazioni dovute a movimenti indesiderati della mano (Bologna et al., 2016a). L'analisi del movimento è stata eseguita utilizzando un software dedicato (SMART Analyzer, BTS Engineering, Italia). Al fine di quantificare le variabili cinematiche, abbiamo usato tecniche di regressione lineare per determinare l'intercetta, che riflette l'ampiezza (in gradi) e la velocità (gradi/s) del movimento, e la pendenza, che riflette il decremento di ampiezza e velocità durante la ripetizione del movimento. Il ritmo del movimento è stato valutato utilizzando il coefficiente di variazione (CV) degli intervalli tra i movimenti (valori più alti rappresentano una minore regolarità del movimento), (Iansek et al., 2006, Bologna et al., 2016a).

Tecniche TMS e registrazioni elettromiografiche

La TMS a singolo e doppio stimolo è stata applicata utilizzando due stimolatori magnetici Magstim (Magstim Company, Regno Unito), collegati a una bobina a 8, tenuta tangenzialmente al cuoio capelluto con l'impugnatura posizionata a $\sim 45^\circ$ rispetto alla linea mediana. Abbiamo definito l'*hot spot* del muscolo abductor pollicis brevis (APB), cioè la posizione ottimale della bobina con la quale si ottenevano i potenziali evocati motori (PEM) nel muscolo bersaglio.

Abbiamo innanzitutto determinato la soglia motoria a riposo (RMT) e la soglia motoria attiva (AMT) in corrispondenza del muscolo APB (Rossi et al., 2009; Rossini et al., 2015). Abbiamo successivamente misurato la curva di reclutamento stimolo-risposta, o curva input-output (I/O) dei PEM, al fine di valutare l'eccitabilità di M1. Abbiamo erogato un totale di 60 impulsi singoli a sei differenti intensità di stimolazione, partendo dall'80% fino al 180% della RMT. La sequenza degli stimoli di differente intensità è stata randomizzata al fine di evitare l'effetto isteresi (Möller et al., 2009).

Abbiamo inoltre valutato l'inibizione intracorticale a breve intervallo (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF), utilizzando tecniche di TMS a doppio stimolo, con uno stimolo condizionante (SC) erogato ad intensità inferiore alla soglia motoria (90% dell'AMT) e uno stimolo test (ST) erogato ad intensità superiore alla soglia motoria e che elicitava un PEM di 1mV). Abbiamo utilizzato un intervallo interstimolo (ISI) tra SC e ST di 2 e 4 ms per la SICI e di 10 e 15 ms per l'ICF (Peurala et al., 2008; Rossini et al., 2015). Sono state acquisite 10 registrazioni per ogni ISI e per ogni intensità. La SICI e l'ICF sono state espresse come rapporto percentuale tra il PEM condizionato e non-condizionato.

Per studiare la plasticità corticale, abbiamo erogato il protocollo PAS su M1 controlateralmente al lato più affetto nei pazienti (Kojovic et al., 2012 e 2015). La tecnica PAS consiste nell'erogazione di 200 stimoli elettrici a livello del nervo mediano al polso per mezzo di un Digitimer DS7 (Digitimer, Regno Unito), accoppiati a stimoli di TMS (regolati all'intensità capace di evocare PEM di 1mV), erogati sull'*hot spot* dell'APB controlaterale (velocità 0,25 Hz, intensità di stimolazione elettrica 2-3 volte la soglia percettiva), (Wolters et al., 2003; Kojovic et al., 2012 e 2015). Ogni stimolo magnetico era preceduto da uno stimolo elettrico con ISI di 21,5 msec. (Stefan et al., 2004; Kojovic et al., 2012 e 2015). L'attività elettromiografica (EMG) è stata registrata dall'APB e dal muscolo primo interosseo dorsale (FDI) del lato più affetto nei pazienti e del lato dominante nei CS, utilizzando elettrodi di superficie. I segnali EMG sono stati amplificati e filtrati (20 Hz-1 kHz) utilizzando Digitimer D360 (Digitimer, Regno Unito). I segnali EMG sono stati registrati e memorizzati su un PC del laboratorio (frequenza di campionamento di 5 kHz) attraverso un convertitore analogico-digitale AD1401 plus (Cambridge Electronic Design, UK). Le successive analisi off-line sono state eseguite utilizzando un software dedicato (Signal@ versione 4.00, Cambridge Electronic Design, Regno Unito). L'ampiezza picco-picco del PEM è stata misurata entro una finestra temporale di 20-40 ms dopo l'artefatto di

TMS. Sono state rifiutate online le tracce elettromiografiche con attività EMG superiore a 100 μ V nella finestra temporale di 200 ms precedente l'artefatto TMS.

Disegno sperimentale

I pazienti sono stati sottoposti a due sessioni (senza e con terapia). Tutti i pazienti sono stati studiati ad almeno 12 ore dalla sospensione dei farmaci dopaminergici nella condizione senza terapia (Defer et al., 1999), o mentre erano nel loro abituale regime terapeutico (con terapia). Il trattamento dopaminergico è stato espresso in termini di dose giornaliera equivalente alla levodopa (LEDD) (Tomlinson et al., 2010). Le due sessioni sono state randomizzate per sequenza ed eseguite a distanza di almeno una settimana. Le registrazioni cinematiche e le misure TMS di eccitabilità corticospinale e intracorticale sono state effettuate in ciascuna sessione al basale (tempo di 10 misurazione B). Per valutare la plasticità M1, abbiamo quindi erogato il protocollo PAS ed analizzato eventuali modifiche dell'eccitabilità di M1 in tre misurazioni: T1 (5 minuti dopo la PAS), T2 (15 minuti dopo la PAS) e T3 (30 minuti dopo la PAS). Quindici MEP a 1 mV di intensità sono stati registrati ad ogni tempo di misurazione (compreso il tempo di misurazione B); per la successiva analisi, i dati raccolti al tempo di misurazione T1, T2 e T3 sono stati normalizzati per quelli del tempo di misurazione B.

Analisi statistica

I dati clinici e demografici sono stati valutati utilizzando test non parametrici (Mann-Whitney U test e Fisher-exact test, rispettivamente). I punteggi MDS-UPDRS (parte III) nelle sessioni senza e con terapia dopaminergica nei pazienti sono stati confrontati utilizzando il test Wilcoxon.

Le differenze tra pazienti senza terapia e i CS nelle variabili cinematiche e nelle soglie motorie sono state valutate attraverso t-test per campioni non accoppiati a due code. Per valutare possibili differenze tra i pazienti con MP e i CS in termini di eccitabilità di M1, è stata utilizzata l'analisi della varianza per misure ripetute (ANOVA), con il fattore "GRUPPO" (MP senza terapia e CS) ed il fattore "INTENSITA' DI STIMOLAZIONE" (80%, 100%, 120%, 160% e 180% della RMT). Nella valutazione della SICI e dell'ICF, abbiamo utilizzato il fattore "ISI" (2, 4, 10 e 15 ms) oltre al fattore "GRUPPO"; la SICI e l'ICF sono state analizzate in due differenti ANOVA poiché rappresentano differenti circuiti corticali. Nel valutare gli effetti della PAS, abbiamo utilizzato i fattori "GRUPPO", "MUSCOLO" (FDI e APB) e "TEMPO DI MISURAZIONE" (T1, T2 e T3). Per valutare gli effetti della terapia nei pazienti, abbiamo aggiunto il fattore "SESSIONE" all'interno del gruppo (SENZA TERAPIA e CON TERAPIA) ai vari ANOVA. Per l'analisi successiva abbiamo calcolato la pendenza della curva I/O (ovvero la pendenza della linea di regressione attraverso il grafico a dispersione dell'ampiezza dei PEM - asse Y vs. intensità di stimolazione - asse X) e la percentuale media delle modifiche in ampiezza dei PEM dopo PAS attraverso i tre punti di misurazione (T1, T2 e T3).

Attraverso un'analisi di correlazione canonica (CCA) abbiamo valutato le relazioni tra (I) le misure neurofisiologiche e i parametri cinematici; (II) le misure neurofisiologiche e i dati clinici e demografici. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$. I dati sono stati analizzati attraverso il software STATISTICA® (StatSoft, Inc).

RISULTATI

Tutti i partecipanti allo studio hanno completato le procedure sperimentali senza effetti avversi. Nessuna differenza è stata riscontrata nell'età ($P = 0,37$) o nella distribuzione del rapporto di genere ($P = 0,23$) tra i pazienti con MP e i CS. Come previsto, il punteggio MDS-UPDRS parte III nei pazienti con MP era significativamente più alto nella sessione "SENZA TERAPIA" rispetto alla sessione "CON TERAPIA" ($30,4 \pm 10,9$ vs $24,8 \pm 10,1$; $P < 0,001$).

Pazienti "SENZA TERAPIA" vs controlli sani

Analisi cinematica del finger tapping

L'analisi ha evidenziato una significativa differenza tra gruppi nell'ampiezza e nella velocità del movimento (con valori più bassi nei pazienti con MP rispetto ai CS (entrambe le $P < 0,01$). L'analisi ha inoltre dimostrato un maggior decremento dell'ampiezza (effetto sequenza), ($P = 0,02$) nei pazienti con MP rispetto ai CS. Nessuna differenza significativa è emersa tra i pazienti con MP e i CS nel numero dei movimenti, nei valori del CV degli intervalli tra i movimenti e nel decremento di velocità.

Eccitabilità corticospinale: soglie motore e curva I/O

L'analisi non ha evidenziato alcuna differenza in RMT o AMT tra pazienti con MP e i CS. Come previsto, l'ANOVA ha evidenziato un effetto significativo del fattore "INTENSITÀ DI STIMOLAZIONE" ($F_{5,190} = 77,26$, $P < 0,001$), con un aumento dell'ampiezza del PEM osservato con l'aumentare dell'intensità di stimolazione. L'eccitabilità di M1, valutata mediante la curva I/O dei PEM, era maggiore nei pazienti con MP "SENZA TERAPIA" rispetto ai CS, come dimostrato da una significativa interazione dei fattori "GRUPPO" x "INTENSITÀ DI STIMOLAZIONE" ($F_{5,190} = 3,19$, $P = 0,009$). Infine, il fattore "GRUPPO" non è risultato significativo ($F_{1,38} = 2,06$, $P = 0,15$).

Eccitabilità intracorticale: SICI e ICF Durante l'analisi della SICI, l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo del fattore "GRUPPO" ($F_{1,38} = 7,89$, $P = 0,007$), con una minore inibizione osservata nei pazienti con MP rispetto ai CS. Anche il fattore "ISI" era significativo ($F_{1,38} = 8,87$, $P = 0,005$), indicando un'inibizione più profonda a 2 ms rispetto che a 4 ms, mentre non c'era interazione significativa "GRUPPO" x "ISI" ($F_{1,38} = 0,86$, $P = 0,35$). L'eccitabilità degli interneuroni facilitatori intracorticali, valutata mediante ICF, non differiva tra i pazienti con MP e i CS, come dimostrato dalla mancanza di effetti significativi dei fattori "GRUPPO" ($F_{1,38} = 0,006$, $P = 0,93$), "ISI" ($F_{1,38} = 0,45$, $P = 0,50$) e interazione "GRUPPO" x "ISI" ($F_{1,38} = 0,11$, $P = 0,73$).

Plasticità di M1: effetti correlati alla PAS

L'analisi dei valori normalizzati ha indicato PEM di ampiezza aumentata dopo PAS nei CS ma non nei pazienti con MP. Questo risultato è supportato da un'ANOVA a misure ripetute, che ha prodotto un effetto significativo del fattore principale "GRUPPO" ($F_{1,38} = 6,12$, $P = 0,01$), con valori più bassi osservati nei pazienti con MP rispetto ai CS. L'analisi ha inoltre mostrato un effetto significativo per il fattore "MUSCOLO" ($F_{1,38} = 6,33$, $P < 0,01$) e per l'interazione "GRUPPO" x "MUSCOLO" ($F_{1,38} = 5,82$, $P = 0,02$) con maggiore facilitazione osservata nell'APB (muscolo bersaglio) rispetto al FDI nei CS ma non nei pazienti con MP. Non sono stati osservati effetti significativi per il fattore "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,76} = 2,43$, $P = 0,09$) o per le interazioni "GRUPPO" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,76} = 0,66$, $P = 0,51$), "MUSCOLO" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,76} = 0,54$, $P = 0,58$) e "GRUPPO" x "MUSCOLO" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,76} = 0,76$, $P = 0,47$).

Pazienti "SENZA TERAPIA" vs pazienti "CON TERAPIA"

Analisi cinematica del finger tapping

L'analisi ha rivelato valori di ampiezza e velocità più alti nella condizione "CON TERAPIA" rispetto alla condizione "SENZA TERAPIA" (entrambi $P_s < 0,001$). Nessun effetto significativo del farmaco è stato osservato per il numero dei movimenti, per i valori di CV degli intervalli tra i movimenti e per le pendenze delle curve di ampiezza e velocità (tutti $P_s > 0,05$).

Eccitabilità corticospinale: soglie motore e curva I/O

L'analisi non ha rivelato alcuna differenza nella RMT ($P = 0,69$) o nella AMT ($P = 0,08$) nella sessione "SENZA TERAPIA" rispetto alla sessione "CON TERAPIA". La curva I/O dei PEM è risultata meno ripida nella sessione "CON TERAPIA" rispetto alla sessione "SENZA TERAPIA". L'ANOVA ha mostrato un effetto significativo per il fattore "SESSIONE" ($F_{1,21} = 10,90$, $P = 0,003$) e per l'interazione "SESSIONE" x "INTENSITÀ DI STIMOLAZIONE" ($F_{5,105} = 4,66$, $P < 0,001$), che indica valori di ampiezza del MEP più elevati nella sessione "SENZA TERAPIA" rispetto alla sessione "CON TERAPIA". Infine, come previsto, è stato rilevato un effetto significativo per il fattore "INTENSITÀ DI STIMOLAZIONE" ($F_{5,105} = 55,68$, $P < 0,001$).

Eccitabilità intracorticale: SICI e ICF

Non sono stati evidenziati effetti chiari della terapia dopaminergica sulla SICI. L'ANOVA non ha rivelato un effetto significativo per il fattore "SESSIONE" ($F_{1,21} = 1,18$, $P = 0,28$) o per l'interazione "SESSIONE" x "ISI" ($F_{1,21} = 0,04$, $P = 0,84$). L'analisi ha rivelato un effetto significativo per il fattore "ISI" ($F_{1,21} = 7,47$, $P = 0,01$), confermando così valori di ampiezza dei PEM ridotti a 2ms rispetto a quelli osservati 4 ms di ISI. Allo stesso modo, non ci sono stati effetti della terapia

dopaminergica sull'ICF come rivelato dalla mancanza di significatività statistica per il fattore "SESSIONE" ($F_{1,21} = 1,08$, $P = 0,30$) e per l'interazione "SESSIONE" x "ISI" ($F_{1,21} = 0,009$, $P = 0,92$). Infine, non è stato evidenziato nessun effetto significativo per il fattore "ISI" ($F_{1,21} = 0,75$, $P = 0,39$).

Plasticità di M1: effetti correlati alla PAS

La terapia dopaminergica ha indotto un aumento di plasticità di M1 nei pazienti con MP. Ciò è stato dimostrato da un significativo effetto del fattore "SESSIONE" ($F_{1,21} = 4,86$, $P = 0,03$). L'analisi post-hoc che ha in seguito evidenziato valori più alti nella sessione "CON TERAPIA" rispetto alla sessione "SENZA TERAPIA" ($P < 0,01$). È stato inoltre evidenziato un effetto significativo del fattore "MUSCOLO" ($F_{1,21} = 7,10$, $P = 0,01$), con risposte più elevate osservate nel muscolo APB rispetto al muscolo FDI, così come è risultata significativa l'interazione "SESSIONE" x "MUSCOLO" ($F_{1,21} = 4,50$, $P = 0,04$), come dimostrato dall'aumento dell'ampiezza dei PEM dopo PAS nella sessione "CON TERAPIA" solo a livello dell'APB e non del muscolo FDI. Infine, non è stato rilevato alcun effetto significativo per il fattore "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,42} = 2,48$, $P = 0,09$) o per le interazioni "SESSIONE" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,42} = 0,18$, $P = 0,82$), "MUSCOLO" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,42} = 0,03$, $P = 0$).

96) e "SESSIONE" x "MUSCOLO" x "TEMPO DI MISURAZIONE" ($F_{2,42} = 0,23$, $P = 0,79$).

Analisi di correlazione canonica

La CCA è una tecnica statistica che permette di massimizzare le possibili correlazioni tra variabili latenti originate da combinazioni delle variabili cinematiche e neurofisiologiche originali. Il primo fattore canonico consiste in una combinazione delle variabili originali, il secondo e il terzo fattore (che non sono correlati al primo) consistono in altre combinazioni di variabili originali. La CCA permette di sviluppare tanti fattori canonici quante sono le variabili nella più piccola di due serie di variabili esaminate. Il test Wilk's lambda ha dimostrato effetti significativi per i primi due fattori canonici (FI, $P = 0,68$ e FII, $P = 0,63$ ma non per FIII, $P = 0,12$); questi risultati mostrano che esiste una relazione globale tra le variabili cinematiche e le variabili neurofisiologiche nei pazienti con MP. Nel dettaglio, il decremento di ampiezza del movimento e la risposta alla PAS contribuiscono al fattore F1. L'intercetta della velocità e la curva I/O dei PEM contribuiscono invece al fattore F2. In altre parole, la velocità di movimento è correlata negativamente con la pendenza della curva I/O dei PEM. Il decremento di ampiezza (effetto sequenza) è correlato positivamente con la risposta alla PAS: maggiore è il decremento di ampiezza durante la ripetizione del movimento, minore è la risposta PAS. Questi risultati indicano nel complesso che i pazienti con maggiore riduzione della velocità di movimento hanno un'eccitabilità più elevata di M1 e che quelli con un maggior effetto sequenza hanno una risposta inferiore a PAS.

Nessuna relazione è emersa nella sessione "CON TERAPIA" tra le alterazioni delle variabili cinematiche e le variazioni di eccitabilità e plasticità di M1. Questo risultato è stato confermato dalla CCA: il test Wilk's lambda non ha infatti mostrato effetti significativi dei fattori canonici (tutti $P_s > 0,05$).

Infine, non sono state rilevate correlazioni significative tra punteggi clinici e parametri neurofisiologici (tutti $P_s > 0,05$).

DISCUSSIONE

L'aspetto innovativo del nostro studio è l'analisi di correlazione che abbiamo eseguito tra i parametri cinematici del movimento e le alterazioni neurofisiologiche di M1 nei pazienti con MP. Abbiamo osservato che le caratteristiche della bradicinesia correlavano con l'eccitabilità di M1 e con le anomalie di plasticità nei pazienti. La terapia dopaminergica ha migliorato sia i parametri di movimento, ovvero ampiezza e velocità, ma non l'effetto sequenza, sia l'eccitabilità e la plasticità di M1. Non è stata tuttavia rilevata alcuna correlazione con i cambiamenti dei parametri cinematici e neurofisiologici indotti dalla terapia.

Pazienti con Malattia di Parkinson vs controlli sani

I nostri risultati hanno confermato diverse osservazioni precedenti. I movimenti di apertura e chiusura delle prime due dita della mano erano caratterizzati da un'ampiezza ed una velocità inferiori nei pazienti con MP rispetto ai CS. L'ampiezza del movimento diminuiva progressivamente durante la ripetizione nei pazienti con MP, confermando che l'effetto della sequenza è una caratteristica motoria della MP (Agostino et al., 2003; Espay et al., 2009 e 2011; Bologna et al., 2016a). Abbiamo inoltre osservato che l'eccitabilità corticospinale è aumentata e che la plasticità di M1 è invece ridotta nella MP (Cantello et al., 2002; Currà et al., 2002; Lefaucheur et al., 2005; Berardelli et al., 2008; Bologna et al., 2016b). Abbiamo infine osservato una ridotta SICI ed una normale ICF nei pazienti rispetto al controllo, confermando il dato di alcuni studi precedenti (Ridding et al., 1995; Kojovic et al., 2012 e 2015; Ni et al., 2013).

Correlazione tra anomalie cinematiche e neurofisiologiche

Nessun precedente studio ha valutato la relazione tra le alterazioni cinematiche e neurofisiologiche utilizzando la CCA nella MP. Con tale approccio, siamo stati in grado di rilevare una correlazione globale tra queste due serie di variabili, ed in seguito di identificare le variabili cinematiche e neurofisiologiche più influenti nel determinare tale correlazione. La nostra analisi ha dimostrato che le anomalie neurofisiologiche di M1 sono predittive delle alterazioni del movimento nella MP. Questo risultato è in linea con i modelli attuali che enfatizzano il ruolo fisiopatologico che M1 gioca nel generare le anomalie del movimento nella MP.

Correlati della bradicinesia (lentezza del movimento)

M1 è la principale area corticale da cui origina il sistema corticospinale. Diversi autori precedenti hanno pertanto ipotizzato che la disfunzione di M1 contribuisca alla bradicinesia nella MP (Berardelli et al., 2001). Pasquereau e collaboratori (2016) hanno recentemente osservato in un modello sperimentale animale di parkinsonismo che la scarica dei neuroni corticospinali di M1 in condizioni di riposo era inferiore rispetto al normale, concludendo che l'ipoattivazione di M1 durante il movimento potrebbe contribuire a determinare la bradicinesia nella MP. Tali dati nella scimmia sembrano essere in contrapposizione con l'aumento della pendenza della curva I/O che osserviamo a riposo nei pazienti con MP. Tuttavia deve essere considerato che la TMS stimola direttamente gli assoni di interneuroni corticali in contatto sinaptico con i neuroni corticospinali. Dato che è improbabile che l'eccitabilità assonale dei neuroni corticospinali sia diversa nella MP rispetto al controllo sano, un aumento del reclutamento corticospinale indica pertanto che le suddette sinapsi facilitatorie siano più efficaci rispetto al normale.

Una possibilità è che tale condizione possa rappresentare un fenomeno di adattamento (Blesa et al., 2017), il cui tentativo è quello di sopperire alla ridotta potenza dei segnali di *input* provenienti da altre aree. Effettivamente il nostro dato, che dimostra che tanto più ripida è la pendenza della curva I/O tanto è più lento il movimento, sarebbe compatibile con il concetto di un progressivo maggiore utilizzo di tale meccanismo di compenso man mano che i sintomi progrediscono. Il nostro dato sarebbe inoltre coerente con l'evidenza dell'assenza di modifiche di eccitabilità di M1 nella MP in fase iniziale (Kojovic et al., 2012 e 2015), ove la riduzione della velocità del movimento volontario è meno evidente (Bologna et al., 2016a), e con l'evidenza di una maggiore eccitabilità nei pazienti con MP avanzata (Valls-Solé et al., 1994), nei quali la velocità del movimento volontario è invece gravemente compromessa (Bologna et al., 2016a).

Un'ipotesi alternativa è che l'aumento di efficacia dell'*input* assonale ai neuroni corticospinali non sia un meccanismo di compenso ma che altresì comporti un'alterazione della relazione tra le variazioni della frequenza di scarica dei neuroni e i parametri cinematici. In questo caso, con il progredire della malattia, l'eccitabilità corticospinale aumenta e la bradicinesia peggiora.

Correlati dell'effetto sequenza

Una seconda caratteristica della bradicinesia oltre la ridotta velocità è il cosiddetto effetto sequenza, una riduzione graduale dell'ampiezza e della velocità durante la ripetizione del movimento. Questo

parametro non correlava con la pendenza della curva I/O, ma correlava negativamente con l'effetto PAS: maggiore è il decremento di ampiezza durante la ripetizione del movimento, minore è l'effetto simil-LTP della PAS. Al momento i meccanismi fisiopatologici dell'effetto sequenza non sono noti. Una possibilità è che il movimento ripetitivo sia sostenuto da una facilitazione a breve termine delle sinapsi motorie di M1. Una ridotta o assente facilitazione nella MP, se non compensata da altri meccanismi, potrebbe quindi determinare una riduzione dell'*output* corticale durante i movimenti ripetitivi, con conseguente riduzione graduale dell'ampiezza del movimento. L'effetto della PAS è solitamente di breve durata (15-30 minuti) e probabilmente dipende dagli effetti a breve termine sulla trasmissione sinaptica piuttosto che dai processi di lunga durata responsabili della LTP. Partendo dal concetto che tali effetti a breve termine impiegano gli stessi meccanismi responsabili della facilitazione a breve termine, si potrebbe spiegare perché la ridotta risposta alla PAS è accompagnata dal maggiore decremento dell'ampiezza dei movimenti volontari. Tale spiegazione sarebbe coerente con le precedenti evidenze che la facilitazione sinaptica a breve termine prodotta dalla TMS ripetitiva a 5 Hz è anch'essa ridotta nella MP (Gilio et al., 2002). L'ipotesi che la riduzione di plasticità di M1 sia un possibile meccanismo fisiopatologico dell'effetto sequenza nella MP è supportata dall'osservazione che questa anomalia è presente nei pazienti con iniziale MP (Kang et al., 2011; Lee et al., 2014; Bologna et al., 2016a). Inoltre, la precoce compromissione sinaptica potrebbe rappresentare l'evento chiave nei pazienti con MP, come dimostrato da diversi studi TMS (Kishore et al., 2012; Kojovic et al., 2012 e 2015) e nei modelli patogenetici e genetici di parkinsonismo (Schirinzi et al., 2016). In contrasto con i nostri dati, che indicano una relazione tra l'effetto sequenza e la plasticità M1, Kang e collaboratori (2010) hanno osservato che la TMS ripetitiva ad alta frequenza su M1 non modificava l'effetto sequenza nella MP. Gli autori, tuttavia, hanno valutato l'effetto sequenza durante il test *pegboard*, che non richiede un'attivazione fine di M1 come quella richiesta dal *finger tapping* (Agostino et al., 2003). In secondo luogo, Kang e collaboratori (2010) hanno basato il loro studio su tecniche di TMS ripetitiva, che, a differenza del protocollo PAS non coinvolgono meccanismi di integrazione sensorimotoria (Wolters et al., 2003; Classen et al., 2004; Carson and Kennedy, 2013). Sebbene abbiamo riscontrato una correlazione tra l'effetto della sequenza e le misure di plasticità M1, riconosciamo che meccanismi alternativi possono contribuire a questa alterazione nella MP.

Effetto in acuto della terapia dopaminergica

Nel presente studio abbiamo riscontrato che la terapia dopaminergica migliorava l'ampiezza e la velocità del movimento, ma non l'effetto sequenza (Espay et al., 2009 e 2011, Bologna et al., 2016a). Abbiamo inoltre riscontrato che la terapia dopaminergica normalizzava l'eccitabilità M1, valutata come pendenza della curva I/O dei PEM e le misure di plasticità (Bologna et al., 2016b, Suppa et al., 2017). Tuttavia, non vi era alcuna correlazione tra i cambiamenti neurofisiologici e quelli cinematici, suggerendo che le anomalie del movimento non sono dovute unicamente al deficit di M1, ma che probabilmente sottendono altri sistemi distribuiti a livello corticale e sottocorticale. La dopamina potrebbe infatti esercitare effetti in acuto a livello di questi altri sistemi, migliorando il movimento indipendentemente dai cambiamenti che determina sull'eccitabilità e la plasticità di M1. Ad esempio, studi di neuroimmagine hanno dimostrato che la terapia dopaminergica induce cambiamenti non solo nell'attività regionale dei gangli basali, ma anche nella connettività tra aree pre-motorie ed M1 e corticostriatale nei pazienti (Michely et al., 2015). Inoltre i nostri risultati indicano che le variabili cinematiche e di TMS presentano una diversa sensibilità ai cambiamenti della terapia. Infine, è possibile che alcune anomalie fisiopatologiche nella MP (incluse ad esempio quelle correlate all'alterata trasmissione GABA-ergica) non siano strettamente dipendenti dalla deplezione dopaminergica.

Limitazioni

A differenza delle registrazioni elettrofisiologiche negli animali o delle registrazioni DBS in pazienti con MP, la TMS fornisce solo misure indirette dell'attività corticale, che possono essere influenzate

da diversi fattori. Inoltre, il nostro studio è stato condotto su un campione relativamente piccolo di pazienti con MP di grado lieve/moderato. Poiché, con il progredire della patologia, si assiste ad un aumento dell'eccitabilità e ad una riduzione della plasticità di M1 (Lefaucheur, 2005, Bologna et al., 2016b), non possiamo escludere che le correlazioni che abbiamo trovato (sia tra la lentezza del movimento e la pendenza della curva I/O che tra l'effetto sequenza e la risposta alla PAS) possano essere il risultato di una correlazione comune con la progressione della malattia. Tuttavia, questo sembra improbabile, dal momento che non abbiamo trovato alcuna correlazione tra i dati neurofisiologici e quelli clinici e demografici. Sono necessari ulteriori studi su pazienti in diversi stadi della MP e studi longitudinali per valutare le correlazioni intra-individuali. Questo approccio permetterebbe anche di comprendere meglio se i cambiamenti neurofisiologici di M1 riflettono cambiamenti compensatori innescati dalla malattia.

CONCLUSIONI

Questo studio fornisce nuove informazioni sul ruolo di M1 nei pazienti con MP ed una più profonda comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle varie caratteristiche della bradicinesia. I risultati supportano l'ipotesi che le diverse alterazioni del movimento riflettono differenti meccanismi fisiopatologici. Mentre le modifiche di eccitabilità di M1 sarebbero alla base della lentezza del movimento, i cambiamenti di plasticità sarebbero alla base dell'effetto sequenza. Sono necessari ulteriori studi per indagare più a fondo in che modo le alterazioni neurofisiologiche di M1 contribuiscano alle anomalie motorie nella MP. La chiarificazione di questo punto costituirebbe un passo importante per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici, basati sull'utilizzo di tecniche di stimolazione cerebrale non invasive, mirati a normalizzare specifiche alterazioni neurofisiologiche sottese alle varie caratteristiche della bradicinesia nella MP.