

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



Tesi di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e
Scienze Materno-Infantili (DINOEMI)

*La quantificazione del sonno REM senza atonia non correla
con la funzionalità dopaminergica nigro-striatale nei pazienti
con disturbi del sonno REM idiopatici*

RELATORE
Prof. Dario Arnaldi

CANDIDATA
Chiara Gilmozzi

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

1. Introduzione.....	3
1.1 Disturbo comportamentale del sonno REM (RBD).....	3
1.2 Neurofisiologia del sonno REM.....	6
1.3 Fisiopatologia dell' RBD.....	10
1.4 Epidemiologia e fattori di rischio.....	10
1.5 RBD e Sinucleinopatie.....	13
1.6 Diagnosi di RBD.....	14
* 1.6.1 Registrazione elettromiografica della polisonnografia.....	16
* 1.6.2 Da qualitativa a quantitativa: l'analisi semi-automatica dell'attività motoria nel sonno REM.....	19
1.7 Ruolo del neuroimaging molecolare.....	25
2. Scopo del lavoro.....	28
3. Materiali e Metodi.....	30
3.1 Pazienti.....	30
3.2 Polisonnografia e algoritmo semi-automatico.....	32
3.3 ¹²³ I-Ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography (¹²³ I-FP-CIT- SPECT).....	35
3.4 N-(3-iodopro-2E-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4'-methylphenyl) nortropane (PE2I) PET.....	37
4. Analisi Statistica.....	39
5. Risultati.....	41
6. Discussione.....	48
7. Conclusioni.....	51
8. Bibliografia.....	52
9. Ringraziamenti.....	60

1 INTRODUZIONE

1.1 DISTURBO COMPORTAMENTALE DEL SONNO REM (RBD)

I disturbi comportamentali del sonno REM (RBD, Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder) corrispondono a eventi disfunzionali che avvengono durante il sonno, ovvero parasonnie, associate alla fase REM. Durante questa fase compaiono vigorosi tentativi di messa in atto di vocalizzazioni e azioni svolte nei sogni, come fu descritto per la prima volta nel 1986 da Carlos Schenck¹.

Mentre il sonno REM fisiologicamente è caratterizzato da atonia, o paralisi motoria scheletrica, accoppiata ad onde elettroencefalografiche (EEG) tipicamente presenti durante la veglia, negli RBD la fase REM si contraddistingue dall'eccessiva attività muscolare tonica e/o fasica, che risulta evidenziabile attraverso la registrazione elettromiografica durante la polisonnografia².

Il cosiddetto sonno REM senza atonia (RSWA, REM-Sleep Without Atonia) è il segno neurofisiologico distintivo degli RBD che, attraverso la video-polisonnografia, permette la diagnosi³. Ciò, associato ad incubi e sogni spiacevoli che caratterizzano gli RBD, si manifesta con movimenti che espongono ad aumentato rischio di risveglio ed infortuni i pazienti ed i compagni di letto degli stessi (**Figura 1**)⁴⁻⁶. Infatti, i tipici comportamenti motori e verbali possono essere sia di tipo violento che non violento, risultando in pugni, calci, morsicature, rovesciamenti del comodino, posizioni sedute sul letto, salti fuori dal letto, discorsi, urla e grida, imprecazioni, pianti, risate e canti^{7,8}. Nei sogni dei pazienti affetti da RBD, i soggetti solitamente sono minacciati o inseguiti da pericoli a cui essi reagiscono, raramente incarnando l'aggressore primario^{9,10}.



Figura 1: lesione associata al sonno in soggetto affetto da RBD isolato, che era saltato fuori dal letto e aveva colpito il comodino con la testa¹⁰.

Sonnambulismo e crisi epilettiche sonno-relate generalmente si differenziano dagli RBD oltre che per il mantenimento degli occhi aperti, anche per le frequenti corse e camminate fuori dal letto⁴.

Nonostante non sia stata identificata una causa scatenante dei più violenti e agitati episodi, questi ultimi possono variare enormemente in intensità e frequenza da notte a notte: una notte possono presentarsi risate e movimenti afinalistici, mentre la notte successiva grida e tentativi di lotta¹⁰.

Gli RBD vengono classificati in base all'eziologia in due grandi sottogruppi:

- 1) Isolati o idiopatici (iRBD), quando non sono associati a conclamati segni di parkinsonismo, demenza o altre malattie neurologiche o psichiatriche significative
- 1) Secondari a:
 - a) Neurodegenerazione α -sinucleinopatia, come la malattia di Parkinson (PD) (25-58% dei casi), demenza con corpi di Lewy (dementia with Lewy

bodies, DLB) (70-80% dei casi) e atrofia multisistemica (multiple system atrophy, MSA) (90-100% dei casi);

- b) Malattie autoimmuni, come narcolessia^{11,12}, sindrome paraneoplastica¹³, encefalite limbica¹⁴, sclerosi multipla^{15,16}, sindrome di Guillain Barré¹⁷ e encefaliti IgLON5¹⁸. Gli autoanticorpi più frequentemente riscontrati risultano essere *anti-N-methyl-D-aspartate receptor* (Anti-NMDAR), IgLON5, *Leucine-rich glioma inactivated 1* (LGI1), *Anti-contactin-associated protein 2* (CASPR2), Ma1 e Ma2;
- c) Sintomatico a lesioni focali troncoencefaliche di tipo vascolare (ischemico^{19,20} o emorragico²¹), demielinizzante²²⁻²⁴, neoplastico^{7,25} e infiammatorio²⁶;
- d) Astinenza acuta da alcohol²⁷;
- e) Iatrogeno, in particolare antidepressivi triciclici (amitriptilina, nortriptilina, imipramine, clomipramina, desipramine, protriptilina, trimipramine), mirtazapina, inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina o SSRI (fluoxetina, paroxetina, sertralina, citalopram) e inibitori della ricaptazione della serotonina-norepinefrina o SNaRI (venlafaxina)²⁸;

Prese insieme, queste osservazioni sembrano suggerire una complessa interazione di diversi sistemi di neurotrasmettitori aventi un ruolo principe nella regolazione del sonno REM. Nonostante questi meccanismi non sono ancora stati compresi completamente, questa complessità può essere spiegata in una certa misura dalla stretta interazione funzionale di diverse popolazioni di neuroni nelle regioni *REM-on* e *REM-off*²⁸.

L'importante associazione che unisce i disturbi neurodegenerativi e gli RBD è motivo di grande interesse scientifico che si traduce in una fitta attività di ricerca che mira a testare nuovi approcci neuroprotettivi e a una migliore comprensione della fisiopatologia e progressione delle sinucleinopatie, fin dai loro stadi prodromici²⁹.

Si è infatti osservato che la presenza degli RBD può precedere la comparsa di parkinsonismo o demenza anche di molti anni^{4,10}.

1.2 NEUROFISIOLOGIA DEL SONNO REM

Per comprendere i disturbi del sonno REM è necessario approfondire i meccanismi che regolano tale fase.

Il sonno REM nei mammiferi comporta un'attività ad elevato stato di eccitazione cerebrale, con entrambe attivazioni toniche (cioè continue) e fasiche (ovvero intermittenti) che avvengono in uno spettro di parametri fisiologici³⁰.

Le diverse nomenclature associate al sonno REM utilizzate dagli esperti includono 1) sonno attivo (*active sleep*) in riferimento all'elevata attività elettrofisiologica cerebrale associabile a uno stato di veglia, come anche al significativo flusso ematico cerebrale, consumo di ossigeno e utilizzo di glucosio; 2) sonno paradosso (*paradoxal sleep*) per l'unione di paralisi muscolare scheletrica e attivazione cerebrale simil-veglia⁷.

Studi su animali hanno dimostrato che due diversi sistemi controllano e regolano la normale fase REM del sonno: uno passivo, che comporta ipotonia muscolare, e uno attivo, che causa paralisi del tono posturale muscolare.

Il primo vede come protagonisti i neuroni serotonergici che durante il sonno cessano l'eccitazione discendente sui neuroni dei nervi cranici e delle corna anteriori spinali, disfacilitandoli. In aggiunta, il secondo sistema permette l'atonia muscolare attraverso la stimolazione acetolinergica del nucleo subcoeruleus, che proietta un output glutamatergico al nucleo gigantocellulare reticolare, contenuto nel bulbo. A sua volta quest'ultimo blocca i motoneuroni spinali inferiori liberando glicina e GABA, due neurotrasmettitori inibitori (**Figura 2**)^{5,31-33}.

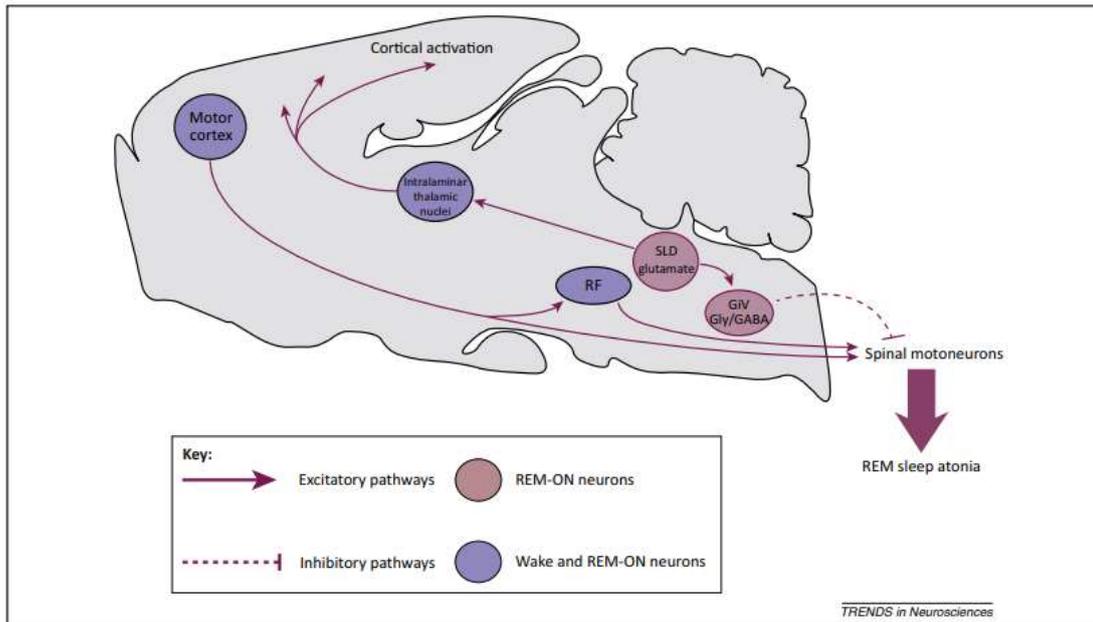


Figura 2: Circuito responsabile del controllo motorio nel sonno *rapid eye movement* (REM) e il suo potenziale coinvolgimento nei disturbi del sonno REM.

Durante il sonno REM, la via discendente dei neuroni glutammatergici *REM-ON* del nucleo sublaterodorsale tegmentale (SLD) eccita i neuroni *REM-ON* rilascianti GABA e glicina nel nucleo gigantocellulare reticolare ventrale (GiV). Questi ultimi proiettano e inibiscono i motoneuroni scheletrici, causando atonia del sonno REM. Un'altra popolazione di neuroni del SLD induce attivazione della corteccia (inclusa la corteccia motoria) durante il sonno REM attraverso proiezioni ascendenti di tipo eccitatorio ai neuroni talamo-corticali.

Nonostante ciò, in pazienti con RBD, la degenerazione del circuito SLD-GiV libera i motoneuroni dalla loro normale fonte di inibizione, che permette alle proiezioni eccitatorie dalla corteccia motoria (attraverso i neuroni del tronco encefalico) di produrre comportamenti motori durante il sonno REM³³.

Questo sistema fu originariamente identificato da Michael Jouvet nel 1965, che ottenne la soppressione della normale atonia del sonno REM nel gatto lesionando l'area subalpha del locus coeruleus (corrispondente al locus subcoeruleus nell'essere umano).

Successivamente, ulteriori studi vennero effettuati sul cervello del ratto, che dimostrarono un'analogia organizzazione dei meccanismi di controllo del sonno REM.

Vennero infatti identificate le cellule del nucleo sublaterodorsale del ponte (SLD) come “REM-ON”, ad indicare la loro maggiore eccitazione durante il sonno REM e attivazione della paralisi muscolare sotto stimolazione farmacologica (**Figura 3**)^{1,2,5,31-}

33

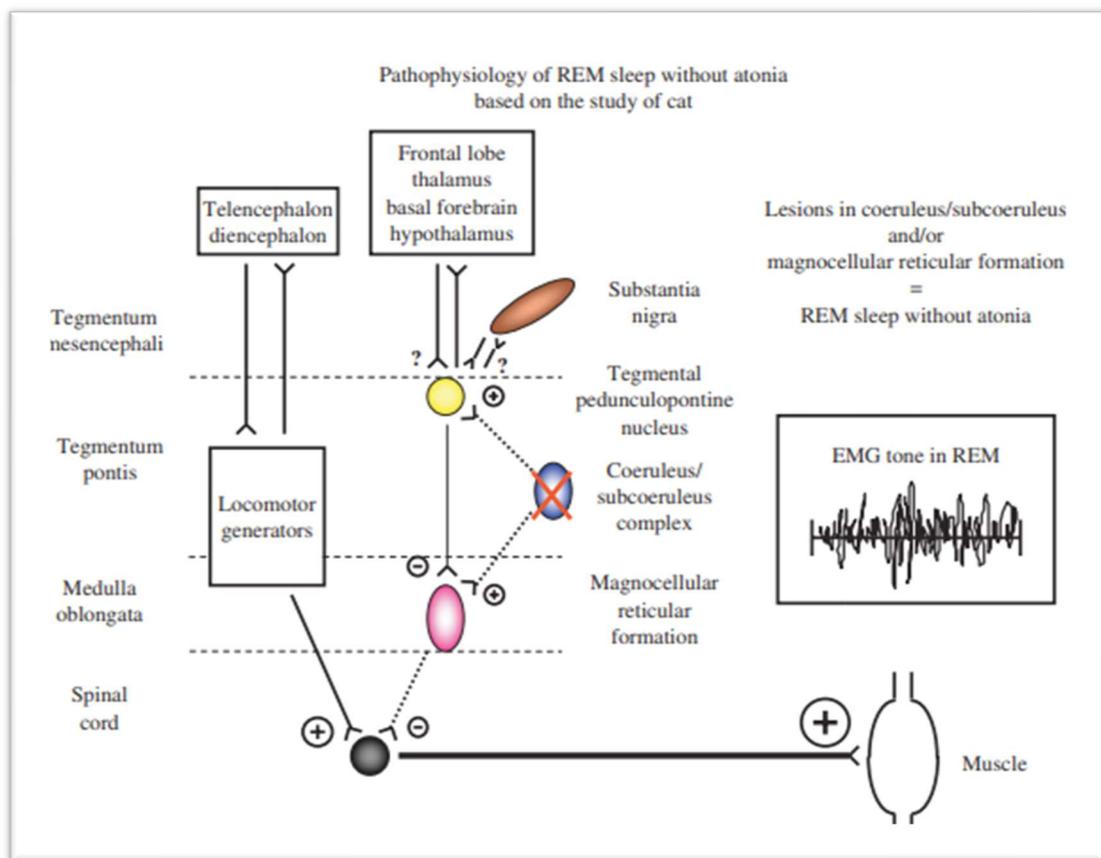


Figura 3: Patofisiologia del sonno REM senza atonia basato su studi effettuati sui gatti.

Le proiezioni eccitatorie sono rappresentate dal segno più (+), quelle inibitorie invece dai segni meno (-) cerchiati, le cui dimensioni indicano il relativo effetto di ogni proiezione sui nuclei sinaptici. Le relative influenze toniche di ogni proiezione sono rappresentate dallo spessore delle linee: maggiore è lo spessore e maggiore è l'effetto³².

EMG = elettromiografia; Medulla oblongata = bulbo; Tegmentum pontis = tegmentino pontino

1.3 FISIOPATOLOGIA DELL' RBD

È stato ipotizzato che la compromissione di una o più aree coinvolte nella genesi del fisiologico sonno REM, con successiva disfunzione dei sopracitati meccanismi, sia alla base della perdita di atonia muscolare durante il sonno REM e della patogenesi dell'RBD³².

Analizzando i pazienti con RBD secondario, si osserva un'associazione tra la sede di lesioni con le aree del tronco encefalico di animali che, se danneggiate, producono segni motori associabili agli RBD⁶.

A conferma di ciò sono stati effettuati studi postmortem su tessuto cerebrale di pazienti con RBD, che hanno individuato la presenza di corpi di Lewy, perdita neuronale e gliosi nel tronco encefalico, in particolare nel nucleo subcoeruleus, gigantocellulare reticolare e peduncolopontino^{6,32,34-38}.

Inoltre, nella regione del nucleo subcoeruleus, corrispondente alla regione dorsale del ponte, sono stati evidenziati al neuroimaging segni di danni in pazienti affetti da RBD idiopatico^{6,39,40}.

1.4 EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

A causa della necessità di un campione di grosse dimensioni da esaminare e della polisonnografia per confermare la diagnosi, i dati epidemiologici risultano essere scarsi.

In contrasto con precedenti studi osservazionali, è stato stimato in un recente studio basato su dati polisonnografici di una grande popolazione che la prevalenza di iRBD tra i 40 e gli 80 anni corrisponde al 1.06%, senza differenze di genere²⁹.

La predominanza maschile della malattia potrebbe essere infatti riconducibile a un bias di selezione: 1) il contenuto dei sogni negli RBD è meno frequentemente violento nelle donne rispetto agli uomini, comportando manifestazioni più lievi 2) e una minore ricerca di aiuto professionale, associata a un maggior imbarazzo della propria condizione. E' inoltre possibile che la maggior affluenza maschile (80%) nei centri del sonno sia attribuibile a 3) un'aumentata capacità delle donne di rilevare un disturbo del sonno nei loro compagni di letto e a ricercare cure mediche per loro⁴.

L'inizio degli RBD idiopatici nella popolazione corrisponde generalmente alla sesta o settima decade di vita. Tuttavia, sono stati evidenziati due gruppi distinti di fasce di età di diagnosi della malattia: ad insorgenza precoce (*early-onset*) e tardiva (*late-onset*), in cui nel primo gruppo l'età media è 34 anni, mentre nel secondo è 70 anni.

Lo studio non solo ha evidenziato una maggiore prevalenza femminile nel gruppo ad insorgenza precoce, ma anche una correlazione con disturbi psichiatrici e utilizzo di antidepressivi⁴¹.

La prevalenza dei disturbi del sonno REM secondari a patologie neurologiche dipende dal disordine primario: mentre più del 70% dei pazienti con demenza con corpi di Lewy (Dementia with Lewy Body, DLB) presenta RBD, nei pazienti affetti da PD la prevalenza di RBD varia tra il 30% ed il 50%. Infine, oltre il 50% dei pazienti con narcolessia mostra RSWA o RBD^{7,42}.

In uno studio multicentrico case-control dei fattori di rischio per RBD idiopatico sono stati riscontrati trauma cranico, esposizione professionale a pesticidi, basso livello di

scolarità, lavoro in fattoria e fumo di sigaretta come potenziali fattori di rischio di RBD⁴³.

Si evince dunque che l'iRBD condivide alcuni fattori di rischio della malattia di Parkinson. Infatti, diversi studi hanno mostrato una significativa associazione tra esposizione professionale a pesticidi e trauma cranico e lo sviluppo della malattia neurodegenerativa. Al contrario, il tabagismo (nicotina) è stato riconosciuto come uno dei fattori protettivi di maggior rilievo (**Figura 4**)⁴⁴.

Inoltre, la stretta correlazione tra iRBD e PD è ulteriormente supportata dall'individuazione di una componente genetica alla base di entrambe le malattie. Un ruolo centrale è ricoperto dal gene SNCA, che codifica per la proteina α -sinucleina, ovvero il biomarker biologico delle sinucleinopatie⁴⁵. Mutazioni del gene codificante per l'enzima glucocerebrosidasi si associano a un fenotipo non-motorio più grave di PD e un'elevata prevalenza nell'iRBD⁴⁶⁻⁴⁸. Differentemente, mutazioni del gene LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) corrispondono alla più frequente causa di PD familiare, i quali però mostrano un ridotto tasso di RBD rispetto alla malattia di Parkinson sporadica^{49,50}.

In conclusione, questi risultati suggeriscono che il fenotipo di RBD idiopatico, ovvero condizione che converge a PD o DLB, potrebbe risultare dalla suscettibilità genetica, anche se un'aggregazione familiare definita è ancora motivo di dibattito⁵¹.

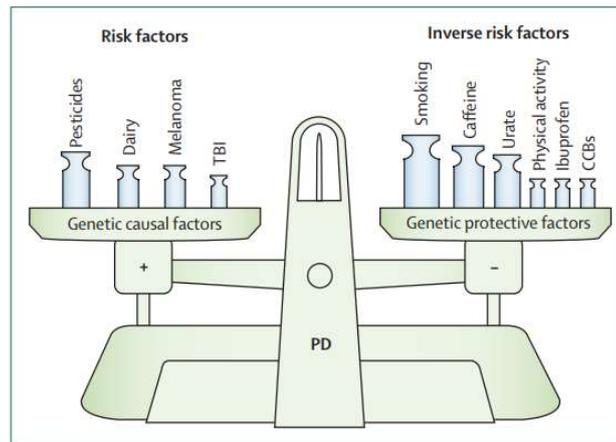


Figura 4: L'equilibrio di fattori genetici e ambientali che sta alla base della malattia di Parkinson

Pesi più grossi sono stati usati per quei fattori con maggiore evidenza epidemiologica.

Sono stati inclusi solo fattori supportati da molteplici studi di prospezione, ma la presentazione non è esaustiva ed è intesa solo per scopi illustrativi.

TBI=traumatic brain injury (trauma cranico); PD=Parkinson's disease; CCBs=calcium channel blocker (beta-bloccanti)⁴⁴

1.5 RBD E SINUCLEINOPATIE

Ci sono diverse rilevanti associazioni tra RBD e la malattia di Parkinson. Lo studio del 1996 di Schenck evidenziò infatti che un terzo dei soggetti affetti da RBD sviluppava la malattia di Parkinson³⁸.

La malattia di Parkinson, come tutte le patologie neurodegenerative, non inizia improvvisamente. Ciò implica che la malattia progredisca attraverso l'evoluzione di diverse fasi, incluse le fasi preclinica e prodromica. La malattia viene diagnosticata quando i sintomi motori (bradicinesia più tremore e/o rigidità) sono eclatanti. Tuttavia, i sintomi non motori possono precedere quelli motori di molti anni. Infatti, i sintomi

non motori, prodromici di PD sono: RBD; disfunzione olfattiva; stipsi; eccessiva sonnolenza diurna; disfunzione sessuale; disfunzione urinaria; depressione⁵².

Pertanto, l'iRBD rappresenta un importante segno precoce delle sinucleinopatie (come PD, DLB e MSA) e oltre l'80% dei pazienti iRBD sviluppa queste malattie neurodegenerative con l'avanzare del tempo. Un recente studio multicentrico ha calcolato l'indice di conversione fenotipica di 6.25% all'anno, con un tasso di conversione progressivamente crescente all'aumentare degli anni: da 10.6% dopo due anni, fino a 73.5% dopo 12 anni⁵³.

Pertanto, considerando l'alto rischio di fenocconversione, i pazienti affetti da iRBD potrebbero essere candidati ideali ai trial neuroprotettivi per il PD, fin dalle fasi prodromiche⁵⁴.

1.6 DIAGNOSI DI RBD

La diagnosi di RBD si basa sulla Classificazione Internazionale dei Disturbi del Sonno, Terza Edizione (ICSD-3), ed è cruciale identificare correttamente questa parasonnia non solo perché potrebbe rappresentare un segno prodromico di malattia neurodegenerativa, ma anche perché può istituire un pericolo per il paziente stesso, oltre al suo compagno di letto, ed essere un disturbo ben curabile⁴.

Gli strumenti necessari per un adeguato percorso diagnostico corrispondono a un questionario in grado di selezionare i pazienti col disordine^{55,56}, associato alla polisonnografia, che risulta essere l'elemento cardine per la diagnosi. Tuttavia, quest'ultimo è uno strumento costoso, richiede un addestramento specializzato e non può es-

sere utilizzato su larga scala in maniera sistematica. Questionari validati per lo screening degli RBD presentano un'elevata sensibilità, ma si associano a un elevato rischio di falsi positivi per la bassa specificità, non essendo in grado di distinguere RBD in particolare da apnee ostruttive del sonno, terrore del sonno e sonnambulismo¹⁰.

I criteri diagnostici per gli RBD includono una storia di episodi ripetuti di vocalizzazioni e/o comportamenti motori complessi, i quali spesso sono in accordo con il contenuto dei sogni; documentazione di questi comportamenti durante il sonno REM attraverso lo studio polisonnografico o presunti accadere durante questa fase del sonno attraverso la storia clinica. Inoltre, è necessario il riscontro polisonnografico di sonno REM senza atonia (**Tabella 1**)⁵⁷.

Inoltre, la registrazione di comportamenti anomali con la video-polisonnografia aumenta l'accuratezza diagnostica.

Devono essere soddisfatti i criteri A-D:

-
- A.** Episodi ripetuti di vocalizzazione e/o comportamenti motori complessi sonno-correlati
 - B.** Tali comportamenti sono documentati mediante polisonnografia durante il sonno REM o, in base alla storia clinica, si presume avvengano durante il sonno REM
 - C.** La polisonnografia dimostra la presenza di sonno REM senza atonia muscolare (RSWA)
 - D.** Il disturbo non è meglio spiegabile da un altro disturbo del sonno, disturbo mentale o medico, uso di farmaci o sostanze

Tabella 1: Criteri diagnostici ICSD-III del disturbo comportamentale del sonno REM (RBD) (adattata da American Academy of Sleep Medicine, International Classification of Sleep Disorders, ICSD-III)⁵⁷.

1.6.1 Registrazione elettromiografica della polisonnografia

Il riscontro di sonno REM senza atonia (RSWA) alla polisonnografia è il substrato neurofisiologico dei disturbi del sonno REM e un requisito per la diagnosi definitiva. L'esame polisonnografico permette di documentare la presenza di un eccessivo tono muscolare e/o un eccesso di contrazioni fasciche del muscolo mentale e/o degli arti durante il sonno REM, insieme ad eventuali comportamenti anomali visibili alla registrazione video⁵.

Il riscontro di RSWA è necessario ma non è sufficiente per porre diagnosi di RBD, dal momento che può essere riscontrato accidentalmente nella popolazione generale senza storia di comportamenti di messa in atto dei sogni o movimenti visibili rilevanti durante la video-polisonnografia (video-PSG)⁵⁸.

Tuttavia, in un recente studio, 1 su 14 pazienti con sonno REM senza atonia isolato al follow up rispondeva ai criteri diagnostici di RBD (7.1%)⁵⁸.

E' importante tenere presente che comportamenti RBD-simili (psuedo-RBD) possono occorrere in persone affette da apnee ostruttive del sonno⁵⁹, sonnambulismo⁶⁰, epilessia notturna, allucinazioni, stati confusionali e pazienti con movimenti periodici degli arti inferiori insolitamente prominenti. Pertanto, solo la video-PSG è in grado di riconoscere questi disturbi ed escludere gli RBD⁴.

Alcuni autori hanno suggerito che lo studio di una singola notte potrebbe non essere sufficientemente adeguato a riconoscere parasonnie⁶¹ e RBD⁶². Tuttavia, è stato dimostrato che una singola notte di video-PSG risulta adeguata per la diagnosi di iRBD per la maggior parte dei pazienti, purché il sonno REM sia presente in quantità sufficiente durante la registrazione⁶³.

La quantificazione della RSWA per la diagnosi di RBD si esegue osservando l'attività elettromiografica di mento o di mento associato ai flessori digitali superficiali (FDS) destro e sinistro degli arti superiori, secondo i parametri di RSWA tonica, fasica o "qualsiasi" ("any").

I valori di cut-off per la stadiazione su epoche da 30 secondi più utilizzati al momento sono dal 14.5% se si utilizza il parametro 'Any' sul muscolo mentale da solo, e del 27.3% se si utilizza il parametro 'Any' sul muscolo mentale in associazione con il parametro REM 'Fasico' sull'FDS⁶⁴. Tuttavia, non è ancora chiaro dalla letteratura se sia sufficiente quantificare la RSWA sul muscolo mentale da solo oppure se sia indispensabile utilizzare anche i muscoli FDS.

D'altro canto, la letteratura è concorde nell'esclusione dalla quantificazione della RSWA la valutazione dell'attività all'EMG degli arti inferiori, in quanto elimina il problema di distinguere tra PLMS (periodic limb movements of sleep) e attività elettromiografica fasica durante il sonno REM⁶⁴.

In **Figura 5** è riportata una dimostrazione dei movimenti del mento e degli arti registrati alla polisonnografia che possono manifestarsi durante il sonno REM dei pazienti affetti da RBD.

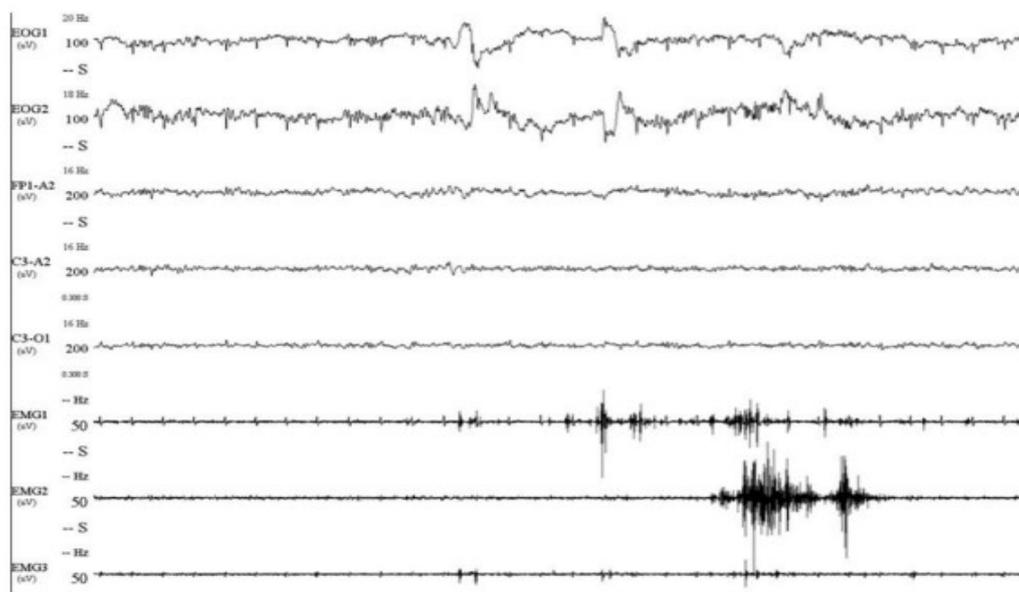


Figura 5: Polisonnografia (30 secondi) durante il sonno REM in pazienti con RBD.

L'EOG (elettrooculogramma) mostra movimenti oculari rapidi come netta deflessione in opposizione di fase; L'EEG (elettroencefalogramma) (Fp-A2, C3-A2, and C3-O1) è tipico del sonno REM, con ritmi misti alpha e theta.

L'elettromiogramma (EMG) (EMG1) del mento, invece che essere totalmente piatto come previsto durante la normale atonia associata al sonno REM, contiene aumentata attività muscolare nella parte sinistra della figura, e l'avambraccio (EMG2) è anormalmente attiva (il paziente alza la mano)⁵.

1.6.2 Da qualitativa a quantitativa: l'analisi semi-automatica dell'attività motoria nel sonno REM

Numerose ricerche sono state effettuate con l'obiettivo di trovare nuovi metodi alternativi all'attuale metodica diagnostica gold standard per gli RBD, rappresentata dalla valutazione manuale^{65,66} dell'analisi elettromiografica durante il sonno REM.

Nella maggior parte dei casi, la quantificazione visiva risulta essere la metodologia di maggior successo, sia per evidenziare gli artefatti, e dunque aumentare il valore predittivo negativo, che a garantire un'elevata accuratezza nella maggior parte dei casi⁶⁵.

Tuttavia, i limiti di questa metodica non sono irrisori, dal momento che richiede molto tempo per essere analizzata da personale esperto (non disponibile in tutti i centri⁶⁷), oltre a comportare delle differenze di tipo operatore-dipendente. Ciò si esprime in un elevato costo e un'applicabilità limitata⁶⁷. Inoltre, la differenziazione tra attività all'EMG tonica e fasica può rappresentare una sfida persino per il più esperto degli operatori⁶⁵: in letteratura è infatti problematica la definizione di *fasico* e *tonico*⁶⁸. Un altro problema di rilievo è l'assenza di criteri precisi per distinguere i segni patologici dai non patologici⁶⁸.

Pertanto, la quantificazione automatica della RSWA rappresenta una interessante alternativa. Ad oggi, lo scoring computerizzato dell'attività muscolare durante il sonno REM è permesso dallo sviluppo di programmi software.

Si ricorda in particolare quello di Ferri *et al.*, che si focalizzò a definire il “*REM atonia index*”, in base al quale è possibile riconoscere pazienti affetti da RBD quando l’indice è inferiore a 0.8, dove 1 corrisponde a completa atonia e 0 assenza totale di atonia.

La **figura 6** mostra chiaramente che i valori più elevati di *Atonia Index* (AI) vennero ottenuti nella popolazione di controllo giovane, seguita da quelli ottenuti in controlli anziani e pazienti con apnee ostruttive del sonno; pazienti con RBD trattati (clonazepam 0.5-1 mg prima di andare a dormire) e pazienti non trattati mostrano valori più bassi dei controlli; inoltre, non c’erano differenze significative tra pazienti affetti da RBD trattati o non trattati con clonazepam. Pazienti affetti da MSA mostrano il più basso indice di atonia⁶⁹.

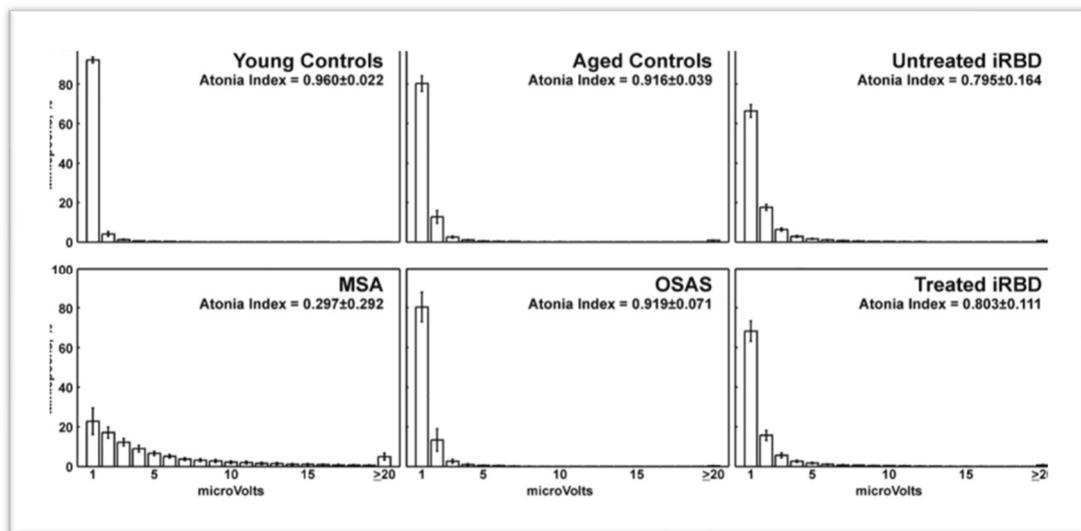


Figura 6: Istogrammi di distribuzione normalizzati delle ampiezze delle mini-epoche nel sonno REM in tutti i gruppi. Si visualizza la percentuale di valori in 20 classi di ampiezza (amp) (1 = amp \leq 1, 2 = 1 < amp \leq 2, ... , 19 = 18 < amp \leq 19, 20 = amp > 19)⁶⁹.

Il software di Mayer *et al.* è basato su attività dell’EMG di breve (inferiore a 0.5 sec) e lunga (superiore a 0.5 sec) durata, dove l’attività EMG è analizzata per ogni finestra

di un secondo oltre a un valore soglia, basato sulla differenza della fascia superiore e inferiore della registrazione elettromiografica del muscolo mentoniero. Con questo sistema automatizzato, utilizzando un cutoff di 2% di sonno REM mostrante un incremento dell'attività motoria, è stato dimostrato che i pazienti con RBD si poterono chiaramente distinguere dai controlli (**Figura 7**)⁶⁸.

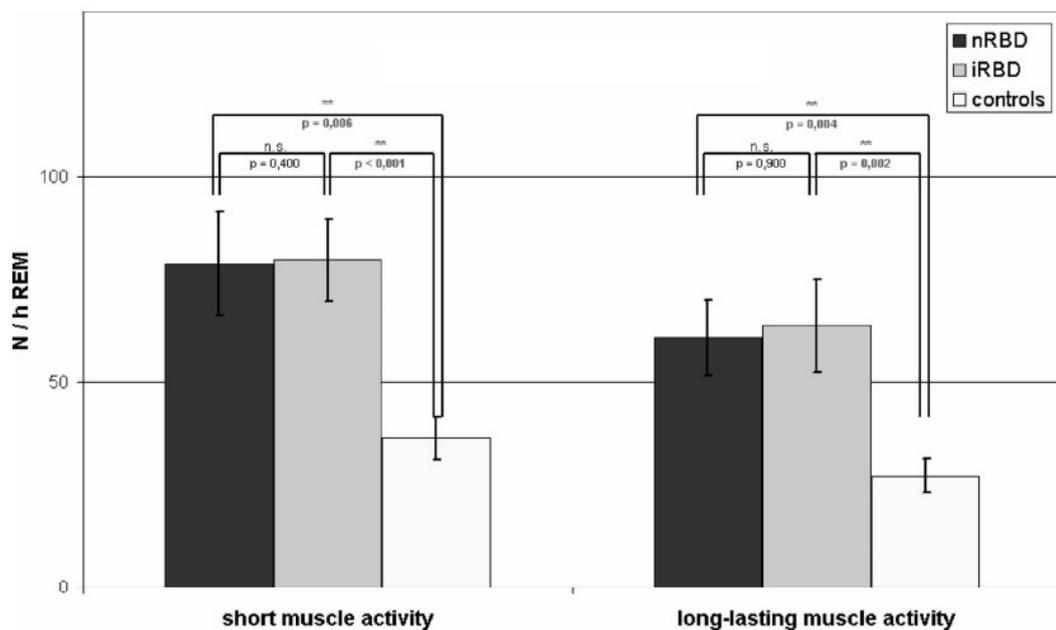


Figura 7: Frequenza dell'attività muscolare nel sonno REM.

L'analisi di attività muscolare di breve e lunga durata ha mostrato un'aumentata quantità di attività muscolare di breve e lunga durata in pazienti con iRBD e pazienti con RBD e narcolessia con cataplessia (nRBD) rispetto ai controlli sani, mentre non vi era differenza tra pazienti iRBD e nRBD⁶⁸.

La capacità dell'algorithmo di riconoscere i pazienti affetti da RBD tra terrori notturni, sonnambulismo, sindrome delle gambe senza riposo e apnee ostruttive del sonno corrisponde a una sensibilità del 72.5% e una specificità dell'86.7%, se usati insieme i valori dell'attività muscolare di breve e lunga durata (corrispondenti all'"Any REM"

dello scoring manuale). Inoltre, lo score automatico è in grado di riconoscere più movimenti rispetto allo scoring manuale⁷⁰.

In un piccolo studio pilota di sei pazienti affetti da PD e sei controlli, Kempfner *et al.* applicò un'analisi semi-automatica di riconoscimento di pattern per discriminare EMG anormali da quelli normali, potendo identificare correttamente i pazienti affetti da RBD con 100% di sensibilità e 100% di specificità, utilizzando strumenti di elaborazione del segnale avanzati combinati con un classificatore statistico⁷¹.

Nel metodo automatizzato utilizzato da Frandsen *et al.*⁶⁶ è stata valutata la combinazione di sei diversi parametri con l'obiettivo di identificare la miglior differenziazione tra RBD e controlli sani (in **Figura 8** un esempio di tracciato EMG). L'attività elettromiografica del muscolo mentale è stata rilevata quando l'ampiezza del tracciato EMG superava un certo valore soglia (MADT, *motor activity detection threshold*) e una sequenza temporale comprendente la MADT chiamata *evento di attività muscolare* (MAE) o più semplicemente *evento*.

- 1) Valore di baseline: sono stati valutati tre diversi metodi per stabilire il baseline di attività EMG:
 - a. Baseline globale, dividendo l'intera registrazione EMG in periodi da 60 secondi e stabilendo il valore mediano di ampiezza del tracciato per ciascuno di questi. Il valore di baseline è stato identificato come il segmento con la minore ampiezza riscontrata;
 - b. Dipendente dallo stadio del sonno: ricerca del minor valore di ampiezza alla EMG per ciascuna fase del sonno separatamente, utilizzando quindi un baseline diverso per ogni fase del sonno;

- c. Finestra mobile: una finestra di 121 segmenti da 30 secondi ciascuno è stata usata per definire la più bassa ampiezza nella registrazione EMG nei 30 minuti che precedono e che succedono il segmento in esame. In questo modo ciascun segmento ha un proprio valore di baseline.
- 2) *MADT*: sono stati valutati diversi valori soglia di 4, 8, 12 e 16 volte il valore di baseline.
 - 3) *Durata*: durata minima dei MAE (eventi) in secondi. Sono stati usati valori di 0.1, 0.3 e 0.5 secondi.
 - 4) *Intervallo tra gli eventi (IEI)*: tempo minimo tra la fine di un MAE e l'inizio del successivo. Sono stati valutati valori di 0.1, 0.3 e 0.5 secondi.
 - 5) *Esclusione*: esclusione di MAE che venivano riscontrati in concomitanza di altri eventi. Sono stati usati tre modelli:
 - a. Nessuna esclusione;
 - b. Esclusione se concomitante con risveglio;
 - c. Esclusione se concomitante con risveglio, apnea o movimento periodico degli arti.
 - 6) *Quantità di sonno REM*: il totale dell'attività EMG durante il sonno REM è stata calcolata con due metodi:
 - a. *REM sleep index*: somma della durata dei MAE nel sonno REM, espressa in percentuale rispetto al totale di sonno REM calcolato;
 - b. *REM sleep mini-epoch index*: numero di mini-epoche di 3 secondi in cui i MAE occupavano più del 50% del tempo, espresso in percentuale rispetto al totale di mini-epoche da 3 secondi nel sonno REM.

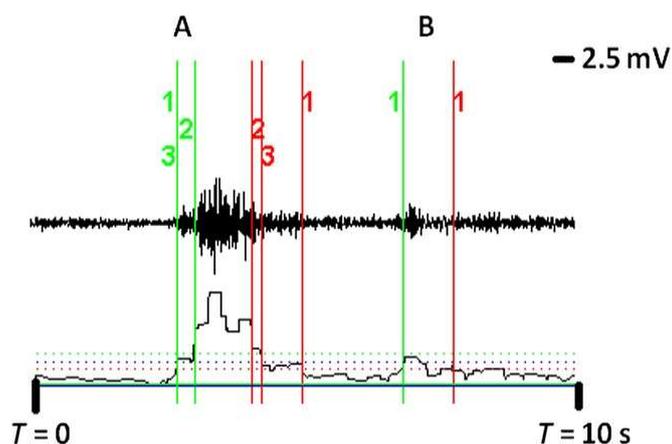


Figura 8: tre metodi di valutazione del baseline applicati su attività motoria di 10 secondi e combinazioni di parametri definenti la durata minima e il periodo minimo tra eventi di attività muscolare (MAE).

Le linee verdi verticali in ogni evento motorio indicano l'inizio dell'evento quando calcolato con ciascuno dei tre modelli di baseline (1=baseline globale, 2=dipendente dalla fase del sonno, 3=finestra mobile) e le linee rosse rappresentano la fine dell'evento.

L'evento A è rilevato da tutti e tre i metodi di riferimento ma è più breve nel metodo dipendente dalla fase del sonno e nella finestra mobile. La parte inferiore della figura include il segnale rettificato uniformato, insieme a linee tratteggiate che rappresentano il livello di cutoff per il rilevamento di eventi motori con la soglia di rilevamento dell'attività motoria per ciascuno dei tre modelli di baseline scelto⁶⁶.

Gli autori hanno riscontrato che la miglior combinazione nella differenziazione tra RBD e controlli (**Figura 9**), con una AUC pari a 0.8080, comprendeva:

- Baseline analizzato con finestra mobile
- MADT uguale a quattro volte il valore di baseline
- Durata di 0.3 secondi
- IEI di 0.5 secondi
- Nessuna esclusione di eventi
- Percentuale totale di sonno REM e mini-epoche di 3 secondi

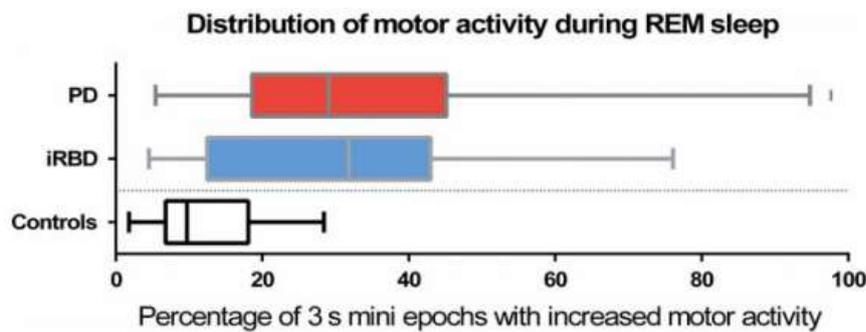


Figura 9: la distribuzione di attività motoria in pazienti affetti da PD, iRBD e controlli con un indice di sonno REM ottimale

1.7 RUOLO DEL NEUROIMAGING MOLECOLARE

I metodi di imaging Single Proton Emission Computed Tomography (SPECT) o Positron Emission Tomography (PET) sono tecniche di imaging molecolare che permettono la valutazione di specifiche funzionalità cerebrali, in maniera quantificata o semi-quantificata, standardizzata.

La malattia di Parkinson è caratterizzata dal punto di vista neuropatologico da una severa perdita di cellule dopaminergiche a carico della sostanza nera mesencefalica, *pars compacta*. Questo comporta il declino dei trasportatori della dopamina (DAT) a livello striatale. Ciò si riflette al DAT SPECT imaging in una significativa riduzione del legame del tracciante in questa sede.

Vista la stretta correlazione tra RBD e PD, l'integrità del sistema dopaminergico è stato ripetutamente valutato in pazienti affetti da iRBD. Una ridotta funzionalità dopaminergica nigro-striatale fu descritta per la prima volta in soggetti affetti da iRBD, se comparati a soggetti sani, grazie a studi effettuati con [¹¹C] dihydrotetrabenazine PET e ¹²³I-N-3-fluoropropyl-2beta-carbomethoxy-3beta-4-iodophenyl tropane (¹²³I-

FP-CIT) SPECT come marcatori, rispettivamente, dei trasportatori vescicolari intracellulari della dopamina e del DAT⁷². Le tecniche di imaging che permettono di studiare il DAT possono essere infatti utilizzate come marker in vivo dell'integrità dei terminali assonici dopaminergici nello striato e, di conseguenza, dei neuroni dopaminergici nigro-striatali⁷³.

Studi trasversali suggeriscono che le tecniche scintigrafiche del DAT sono in grado di discriminare i pazienti con PD precoce dai controlli sani. In particolare, l'imaging DAT SPECT risulta essere uno strumento sensibile nel rilevamento della perdita del DAT striatale in pazienti con PD precoce, e potrebbe essere in grado di evidenziare deficit dopaminergici anche nella fase premotoria della malattia, oltre a permettere di misurare la progressione della degenerazione dopaminergica nel PD⁷³.

In studi prospettici effettuati su pazienti con iRBD, sono state riscontrate disfunzioni dopaminergiche nigro-striatali di tipo progressivo, indicando un continuum di riduzione da RBD subclinico a clinico fino alla diagnosi di PD⁷², suggerendo che l'imaging dopaminergico possa avere il potenziale di quantificare la progressione attraverso la fase prodromica della malattia.

La deafferentazione dopaminergica nigro-striatale, soprattutto a livello del putamen, è stata ripetutamente riscontrata in pazienti affetti da iRBD quando comparati ai controlli sani⁷⁴. Tuttavia, pazienti con iRBD dimostrano un'aumentata captazione del DAT rispetto ai pazienti con PD. In particolare, la captazione del DAT a livello del putamen risulta essere significativamente aumentata negli iRBD comparati ai pazienti con PD^{38,75-81}, ma simili valori di captazione a livello del caudato tra i due gruppi⁷². Ciò è dovuto alla perdita di integrità dopaminergica che nel PD tipicamente inizia nel

putamen dorsale⁸², mentre la deafferentazione nigro-caudata sembra essere una caratteristica specifica dell'RBD, sia nella forma idiopatica che associato a PD⁸³.

Diversi studi hanno dimostrato che le anomalie nigro-striatali dopaminergiche all'imaging identificano pazienti iRBD a maggior rischio di conversione fenotipica a sinucleinopatie a breve termine^{84,85}. Pertanto, diagnosi di RBD e disfunzione dopaminergica presinaptica potrebbero essere i due marcatori chiave in grado di identificare pazienti eleggibili nei trial neuroprotettivi⁷⁴.

Nuove metodiche di neuroimaging molecolare sono state studiate al fine di migliorare le capacità di studio della via dopaminergica nigro-striatale nei pazienti affetti da PD. Un recente studio longitudinale ha indagato la sensibilità di N-(3-iodopro-2*E*-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4'-methylphenyl) nortropane (PE2I) alla PET nel rilevare differenze di severità motoria in pazienti con PD precoce-moderato rispetto alla PET con 18F-Dopa (un analogo fluorurato di L-dopa)⁸⁶. Lo studio non solo ha rilevato una maggiore sensibilità del primo rispetto al secondo, ma ha anche dimostrato che il declino della densità del DAT striatale, utilizzando ¹¹C-PE2I, è strettamente associato con la progressione motoria all'avanzare del tempo e della malattia. Infatti, ¹¹C-PE2I è un radioligando ad alta selettività esclusivamente per il DAT, al contrario di altri marcatori tipicamente utilizzati per studiare il DAT come ¹²³I-FP-CIT nella SPECT, che presenta alta affinità anche per i trasportatori della serotonina (SERT) e moderata affinità per i trasportatori della norepinefrina (NET)^{86,87}.

2. SCOPO DEL LAVORO

Nonostante il *gold standard* per la diagnosi di RBD risulta essere la valutazione e lo scoring manuale del tracciato elettromiografico registrato durante la polisonnografia, con l'evolversi della tecnologia, l'algoritmo semi-quantitativo rappresenta un'alternativa in grado di ridurre costi e tempi, permettendo dunque una maggiore applicazione su un maggior numero di pazienti.

Inoltre, è stato dimostrato che i pazienti affetti da iRBD presentano già le alterazioni della via dopaminergica nigro-striatale caratteristiche del PD. Tuttavia, non è ancora chiaro in letteratura se vi sia una correlazione tra la quantità di RSWA e l'entità della deafferentazione dopaminergica nigro-striatale.

Il presente lavoro è suddiviso in due step:

- 1) L'obiettivo del primo step è di validare la capacità diagnostica del metodo semi-quantitativo di analisi dell'attività muscolare utilizzato da Frandsen *et al.* in un campione indipendente genovese di soggetti affetti da iRBD, PD e in controlli sani, e di verificare la correlazione dei risultati ottenuti tramite tale metodica con l'attività dopaminergica nigro-striatale studiata attraverso esame SPECT dopaminergico presinaptico (DAT SPECT);
- 2) L'obiettivo del secondo step è di indagare la presenza di alterazioni della via dopaminergica nigro-striatale in un campione danese di soggetti affetti da iRBD attraverso la N-(3-iodopro-2*E*-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4'-methylphenyl) nortropone (PE2I) PET. Successivamente, verrà investigata la correlazione tra la quantificazione della RSWA, sempre mediante il metodo

di Frandsen *et al.*, e la funzionalità dopaminergica nigro-striatale studiata mediante la ^{11}C -PE2I PET.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Per la prima parte del lavoro, sono stati studiati pazienti selezionati dall'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino di Genova, affetti da RBD idiopatico (iRBD), malattia di Parkinson (PD) senza RBD, PD con RBD e, infine, controlli sani.

Per la seconda parte del lavoro, sono stati studiati pazienti della coorte danese affetti da iRBD, selezionati dall'ospedale di Glostrup (Glostrup Rigshospitalet, ospedale altamente specializzato in Danimarca).

I criteri di inclusione sono stati la diagnosi di iRBD confermata da video-polisonnografia⁵⁷ e, per la coorte genovese, la diagnosi di PD, in accordo agli attuali criteri diagnostici internazionali⁸⁸. I soggetti affetti da PD erano tutti di nuova diagnosi, e sono stati esaminati prima di intraprendere terapia dopaminergica.

I criteri di esclusione dallo studio sono stati: evidenza di qualsiasi malattia neurologica e psichiatrica clinicamente significativa come la demenza, il parkinsonismo conclamato, l'ictus, il trauma cranico maggiore ed i tumori cerebrali, storia di epilessia (ad eccezione dell'epilessia dell'infanzia), malattia polmonare, gastrointestinale, renale, epatica, endocrina o cardiovascolare clinicamente significativa ed attiva o disturbi metabolici.

I soggetti affetti da iRBD, per definizione, hanno tutti effettuato una PSG a conferma della presenza di RBD, così come i soggetti affetti da PD ed i controlli. Le registrazioni polisonnografiche sono state effettuate in assenza di farmaci

neurotropi o psicotropi di alcun tipo. La presenza di RBD nei soggetti PD è stata definita secondo i criteri dell'ICSD-3, ovvero mediante:

- intervista clinica semi-strutturata, effettuata da un medico Neurologo esperto in RBD, per investigare la presenza anamnestica suggestiva di RBD;
- Presenza di “eccessiva” attività muscolare alla PSG, secondo gli attuali criteri internazionali⁵⁷.

Inoltre, tutti i soggetti hanno effettuato il “Mini-Mental State Examination” (MMSE) per valutare le capacità cognitive generali dei soggetti e la Movement Disorder Society – Unified Parkinson Disease Rating Scale, parte motoria (MDS-UPDRS-III) per valutare la presenza di parkinsonismo. Sono state inoltre investigate le attività della vita quotidiana di base (ADL) e strumentali (IADL) per escludere la presenza di demenza.

I pazienti iRBD con conferma diagnostica PSG ed i pazienti PD della coorte genovese sono stati sottoposti a ¹²³I-FP-CIT-SPECT, che ha permesso di valutare la funzione dopaminergica nigro-striatale. Nei pazienti iRBD della coorte danese, la funzionalità dopaminergica nigro-striatale è stata studiata mediante ¹¹C-PE2I-PET.

3.2 POLISONNOGRAFIA E ALGORITMO SEMI-AUTOMATICO

La polisonnografia (PSG) è una metodica multiparametrica che permette di monitorare e registrare il sonno. Il monitoraggio del sonno con PSG è stato effettuato nel corso di una singola notte in accordo con i criteri internazionali raccomandati dall'American Association of Sleep Medicine (AASM).

La registrazione EEG è stata effettuata con un montaggio a tre derivazioni, bilateralmente: F3, F4, C3, C4, O1 e O2 con montaggio bipolare utilizzando il sistema internazionale "10-20" (figura 10).

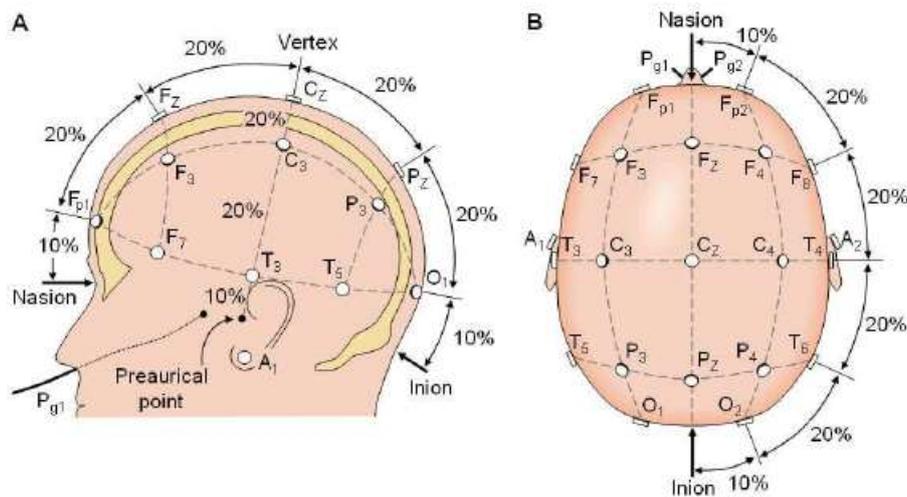


Figura 10: schematizzazione del sistema di applicazione degli elettrodi "10-20" per EEG nella polisonnografia.

È stata effettuata la registrazione di due tracce EOG (elettro-oculogramma), una per ogni occhio, 1 cm sotto il canto esterno dell'occhio, con montaggio monopolare, usando come referenza il mastoide controlaterale.

L'EMG è registrata attraverso il posizionamento di elettrodi sul muscolo mentale.

Inoltre, sono stati utilizzate le seguenti derivazioni poligrafiche aggiuntive:

- Due EMG sui muscoli tibiale anteriore destro e sinistro.
- Due fasce, una toracica ed una addominale, per la valutazione delle rispettive escursioni respiratorie
- Una cannula per la registrazione del flusso oro-nasale e per la valutazione delle eventuali ipo/apnee durante il sonno (vanno sempre correlate alle escursioni toraciche e addominali). Se presenti, calcolando l'*Apnea Hypopnea Index* (AHI) si ricava uno score indicativo della gravità del disturbo.
Le apnee possono compromettere la qualità e la durata del sonno
- Un pulsossimetro per la valutazione dell'ossigenazione periferica e il monitoraggio delle sue eventuali variazioni durante le ipo/apnee (la desaturazione di O₂ è un sintomo aggravante)
- Una singola derivazione ECG per l'attività cardiaca basale

Per il monitoraggio delle varie derivazioni, sono stati applicati i seguenti parametri di acquisizione, in accordo con le linee guida AASM:

- Per le derivazioni EMG sono state utilizzate una frequenza di campionamento a 256 Hz, un filtro passa-basso a 100 Hz e uno passa-alto a 10 Hz
- Per le derivazioni EEG e EOG sono state utilizzate una frequenza di campionamento a 256 Hz, un filtro passa basso a 35 Hz e un filtro passa alto a 0.3 Hz

- Per le fasce addominali sono state utilizzate una frequenza di campionamento a 128 Hz, un filtro passa basso a 15 Hz e un filtro passa alto a 0.3 Hz
- Per il montaggio ECG sono state utilizzate una frequenza di campionamento a 128 Hz, un filtro passa basso a 70 Hz e un filtro passa alto a 0.3 Hz

La quantificazione dell'attività muscolare durante la fase REM è stata eseguita sia manualmente tramite analisi visiva, sia in maniera semi-automatica con impiego dell'algoritmo ottimizzato utilizzato da Frandsen *et al.*⁶⁶.

Lo scoring manuale è avvenuto in accordo con Frauscher *et al.*⁶⁶, sono state usate epoche di 30 secondi e sono stati analizzati i seguenti parametri EMG:

- “REM tonico” per qualsiasi attività di tipo tonico
- “REM fasico” per qualsiasi attività di tipo fasico
- “*Any REM*” per qualsiasi epoca non atonica

Per quanto riguarda la metodica semi-automatica, d'ora in poi si farà riferimento alla quantificazione del RSWA ottenuta tramite l'impiego dell'algoritmo di Frandsen *et al.*⁶⁶ con il nome di “Automatic RSWA”. È stato utilizzato l'algoritmo ottimizzato per i parametri per il quale è stata riscontrata la migliore capacità di discriminazione tra RBD e controlli sani, ovvero:

- Baseline analizzato con finestra mobile
- MADT uguale a quattro volte il valore di baseline
- Durata di 0.3 secondi
- IEI di 0.5 secondi
- Nessuna esclusione di eventi
- Percentuale totale di sonno REM e mini-epoche di 3 secondi

I valori del parametro Automatic RSWA per ciascun tracciato EMG sono stati quindi espressi con un valore da 0 a 1 che rappresenta il numero di mini-epoche di 3 secondi in cui i MAE (ovvero le sequenze temporali in cui l'attività muscolare presentava un'ampiezza sopra soglia) occupavano più del 50% del tempo, rispetto al totale di mini-epoche da 3 secondi nel sonno REM. Il valore 0 indica quindi la completa presenza di atonia muscolare, mentre 1 la completa assenza di atonia muscolare nel tracciato analizzato.

3.3 ^{123}I -Ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography (^{123}I -FP-CIT-SPECT)

Tutti i pazienti genovesi affetti da iRBD confermato da PSG e da PD sono stati sottoposti ad una ^{123}I -FP-CIT-SPECT, al fine di valutare la presenza di un'iniziale degenerazione nigro-striatale.

^{123}I -FP-CIT-SPECT è stata eseguita per mezzo di una gamma camera Millennium VG (GE Healthcare) a due teste, con collimatori a fori paralleli, per le basse energie ad alta risoluzione. Le immagini sono state acquisite 180-240 minuti dopo la somministrazione per via endovenosa di 185 MBq di ^{123}I -FP-CIT (DatScan, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Gli esami SPECT di base sono stati eseguiti nello stesso laboratorio, con la stessa gamma-camera ed utilizzando gli stessi parametri di acquisizione e di ricostruzione, secondo le linee guida dell'Associazione europea di medicina nucleare. L'inizio della scansione avviene tra le 3 e le 6 ore successive alla somministrazione del tracciante. È stato applicato un protocollo “*step and shoot*” con un

raggio di rotazione <15 cm, consentendo un'acquisizione di 120 proiezioni distribuite sui 360°, con un conteggio totale compreso tra 2.5 e 3 milioni di colpi radioattivi. Grazie ad uno zoom elettronico, applicato durante la fase di acquisizione dei dati, la dimensione dei pixel sulla matrice di acquisizione ha raggiunto i 2.4 millimetri. Inoltre, durante la fase di ricostruzione, è stato utilizzato uno zoom digitale che ha permesso di ricostruire dei voxel isotropici di 2.3 mm. È stato utilizzato l'algoritmo *Ordered Subsets Expectation Maximation* (OSEM) per la ricostruzione delle proiezioni, seguito da un sistema di filtri successivi (*3D Gaussian filter with Full Width-Half Maximum*, FWHM=8mm). Le immagini sono state analizzate e ricostruite dall'algoritmo automatico BasGan⁸⁹, con l'apposizione di una maschera striatale tridimensionale (3D) ad alta definizione, ricostruita in base alle informazioni anatomiche fornite dal neuro-atlante di Talairach e Tournoux. La captazione del tracciante a livello dei nuclei caudato e putamen è stata normalizzata utilizzando una regione di interesse posizionata nelle regioni occipitali (captazione di fondo), in ciascun soggetto, per poter calcolare gli SBR (*specific to non-displaceable binding ratio*), ad esempio:

$$\text{SBR putamen} = (\text{Captazione Putamen} - \text{Captazione di fondo}) / \text{Captazione di fondo}.$$

Successivamente gli SBR sono stati convertiti in punteggi Z (a cui si farà riferimento in seguito come Z caudato e Z putamen), normalizzati per età, basandosi su di un database di oltre cento soggetti normali forniti dalla banca dati europea ENC-DAT⁹⁰.

3.4 N-(3-iodopro-2E-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4'-methylphenyl) nortropane (PE2I) PET

Tutti i pazienti danesi con iRBD confermato da PSG sono stati sottoposti ad una ¹¹C-PE2I PET, al fine di visualizzare e quantificare il DAT non solo a livello striatale ma anche in regioni extra-striatali, come la sostanza nera (SN). Il tracciante ¹¹C-PE2I è altamente selettivo per il DAT e mostra un elevato rapporto target-background e una buona affidabilità test-retest.

Secondo le linee guida⁹¹, la quantificazione assoluta richiede una durata di acquisizione dell'imaging di almeno 90 minuti, a causa del lento wash-out cerebrale. La quantificazione inoltre è stata effettuata utilizzando il cervelletto come regione di riferimento. È stato utilizzato un metodo semplificato per la quantificazione dell'SBR acquisendo un'immagine statica intorno al picco del legame specifico, tra 16.5 e 42 minuti dopo l'iniezione. L'acquisizione dinamica suggerita per stimare il "*binding potential*" (BPND) richiede una durata di 60 minuti. La dose di N-(3-iodopro-2E-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4'-methylphenyl) nortropane nell'adulto varia tra 100 e 250 MBq (tipicamente 200 MBq). L'SBR viene calcolato con la sostanza grigia cerebellare come riferimento; valori target sono rappresentati da SBR Caudato, SBR Putamen, SBR Striatum, Putamen/Caudate ratio; *Hemisphere asymmetry index* = (R-L)/(R+L). E' poi stato eseguito l'algoritmo Ordered Subsets Expectation Maximation (OSEM) per la ricostruzione delle proiezioni, con una risoluzione finale dell'immagine di 5-8 mm.

Successivamente gli SBR sono stati convertiti a punteggi Z (Z-score) normalizzati per età, secondo un database locale appartenente al Rigshospitalet di Glostrup, diretto dal professore di neuroimaging PET Ian Law, basato su pazienti studiati con entrambe le metodiche DAT-SPECT e ^{11}C -PE2I PET.

4. ANALISI STATISTICA

Step 1:

È stata effettuata una prima analisi descrittiva per confrontare i principali parametri clinici, demografici e polisonnografici tra i quattro gruppi di studio (Controlli, CTR; iRBD; PD senza RBD, PDnoRBD; PD con RBD, PD+RBD). Le variabili continue sono state confrontate tra i gruppi mediante analisi univariata della varianza (ANOVA), utilizzando analisi post-hoc di Bonferroni, mentre le variabili categoriali mediante Fischer's Exact Test.

Per effettuare un confronto tra l'Automatic RSWA e lo scoring visivo dell'attività motoria, è stata effettuata una correlazione di Pearson.

Per verificare la capacità di ciascuno dei parametri di RSWA visivi (REM tonico, REM fasico e "Any REM") e del metodo semi automatico (Automatic RSWA) di differenziare i soggetti senza RBD (CTR e PDnoRBD) rispetto ai soggetti con RBD (iRBD e PD+RBD), è stata effettuata un'analisi *receiver operating characteristic* (ROC). Successivamente, le curve ROC dei quattro parametri di RSWA sono state confrontate tra di loro per investigare se ci fosse uno o più parametri significativamente superiore agli altri nel differenziare i soggetti con RBD da quelli senza.

Infine, sono state eseguite nuovamente correlazioni di Pearson per indagare eventuali correlazioni tra i parametri di RSWA, sia di tipo visivo che semi-automatico, con alterazioni dell'attività dopaminergica nigro-striatale studiata attraverso esame DAT SPECT.

Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

Step 2:

Per quanto riguarda i dati inerenti ai pazienti danesi e la seconda parte del progetto, le associazioni tra la quantificazione motoria in ogni fase del sonno (fase REM e fasi Non-REM (NREM) S1, S2 ed S3) ottenuta tramite l'algoritmo semi-automatico di Frandsen *et al.*⁶⁶, e le caratteristiche dell'imaging ¹¹C-PE2I PET a livello dell'intero striato, del solo putamen, e del rapporto caudato/putamen sono state esaminate con l'analisi di regressione. Sono state considerate come variabili indipendenti i valori ottenuti dalla quantificazione dell'attività motoria durante le varie fasi del sonno, mentre sono state considerate come variabili dipendenti i dati ottenuti tramite la PET. Ogni analisi statistica è stata effettuata tramite il software Excel.

Sono stati calcolati il coefficiente di determinazione, ovvero l'R quadro, al fine di comprendere la capacità predittiva del modello di regressione lineare utilizzato, ed il livello di significatività F , che indica la rilevanza della variabile esplicativa (ovvero la quantificazione dell'attività motoria) nell'insieme del modello.

Per stabilire il livello di significatività statistica è stata applicata la correzione di Bonferroni per confronti multipli.

5. RISULTATI

Per la prima parte del lavoro, sono stati studiati 126 pazienti della coorte genovese, di cui 45 affetti da RBD idiopatico (iRBD), 24 da malattia di Parkinson (PD) senza RBD, 46 da PD con RBD e, infine, 11 controlli sani. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella **Tabella 2**.

	CONTROLLI (n=11)	PD senza RBD (n=24)	iRBD (n=45)	PD con RBD (n=46)
Maschi	5 (45.45%)	13 (54.16%)	36 (80.00%)	29 (63.04%)
Femmine	6 (54.55%)	11 (45.83%)	9 (20%)	17 (36.96%)
Età	67.27 ± 11.41	66.67 ± 9.47	68.51 ± 7.79	72.46 ± 6.25

Tabella 2: caratteristiche demografiche dei pazienti appartenenti alla coorte genovese.

Nella presente tesi vengono esposti i risultati dello step 2, in quanto lo step 1 è stato oggetto di una tesi precedente. In breve, per quanto riguarda i risultati dello step 1, l'analisi visiva, in particolare il parametro “*Any REM*”, è risultata la migliore nel diagnosticare l'RBD (AUC=0.99). L'analisi semi-automatica ha mostrato una buona, seppur significativamente inferiore, capacità discriminativa (AUC=0.86). L'accuratezza dell'algoritmo è risultata paragonabile agli altri metodi semi-automatici riportati in letteratura. Nessuno dei parametri RSWA è risultato correlato con i dati ¹²³I-FP-CIT-SPECT.

Lo step 2 è stato condotto su 25 pazienti della coorte danese affetti da iRBD, di cui 17 uomini e 8 donne. L'età media della coorte al momento della registrazione polisonnografica è di 65 ± 8.68 anni. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in

Tabella 3.

<i>Sesso</i>	
maschi	17 (68%)
femmine	8 (32%)
<i>Età</i>	
maschi	66 ± 7.55
femmine	63 ± 11.06

Tabella 3: caratteristiche demografiche dei pazienti appartenenti alla coorte danese.

La quantificazione dell'attività muscolare a carico del muscolo mentale è stata ottenuta durante le fasi del sonno:

- REM (sonno paradossoso)
- S1 (addormentamento)
- S2 (sonno leggero)
- S3 (sonno profondo)
- NREM (ovvero S1 + S2 + S3)

Per ogni fase è stata calcolata:

- La percentuale delle mini-epoche (*% mini epeches*)
- La percentuale dei movimenti mentonieri durante la specifica fase (*duration*)
- La durata dei movimenti mentonieri durante la specifica fase (*% duration*)

Per quanto riguarda i dati ottenuti tramite ^{11}C -PE2I PET, sono stati calcolati i valori di:

- SBR e Z-score a livello striatale e del solo putamen per ogni emisfero;

- Rapporto putamen/caudato (Ratio Putamen/Caudatus) destro e sinistro.

Nelle **Tabelle 4, 5 e 6** vengono riportati i valori di R quadro e della significatività F ottenuti rispettivamente per ogni correlazione tra la percentuale delle mini-epoche, la durata e la percentuale della durata, con le fasi del sonno e i valori SBR e Z-score.

In **Tabella 7** vengono riportati i valori di R quadro e della significatività F ottenuti per ogni correlazione tra i valori SBR e Z-score del rapporto Putamen/Caudato destro/sinistro e la percentuale delle mini-epoche, la durata e la percentuale della durata delle diverse fasi del sonno.

Nessuna correlazione sopravvive alla correzione per confronti multipli di Bonferroni.

			<i>Striatum</i>		<i>Putamen</i>	
			<i>R square</i>	<i>Significance F</i>	<i>R square</i>	<i>Significance F</i>
<i>% mini epeches</i>	<i>REM</i>	Right z-score	0.006839278	0.663951166	0.004425722	0.72687704
		Left z-score	0.002500779	0.792990393	0.001110348	0.861233207
		Right SBR	0.003581736	0.753405704	0.002498888	0.793067011
		Left SBR	0.001161534	0.858102135	0.000220202	0.937964705
	<i>NREM</i>	Right z-score	0.057972928	0.246293178	0.042737837	0.321440468
		Left z-score	0.047760659	0.293938079	0.03645452	0.360596649
		Right SBR	0.066900934	0.211874481	0.053204892	0.267298043
		Left SBR	0.052282021	0.271603612	0.040380853	0.33545547
	<i>S1</i>	Right z-score	0.007861864	0.67341157	0.018207274	0.520170612
		Left z-score	0.010935495	0.618862252	0.016346937	0.542487835
		Right SBR	0.003825194	0.768994847	0.010943417	0.618734543
		Left SBR	0.007375819	0.68313843	0.012512143	0.594497117
	<i>S2</i>	Right z-score	0.055571532	0.256620345	0.046101374	0.302689636
		Left z-score	0.044094973	0.313705343	0.037572715	0.35319336
		Right SBR	0.056300222	0.253434141	0.049093252	0.287132384
		Left SBR	0.043053286	0.319621389	0.037284308	0.355083558
	<i>S3</i>	Right z-score	0.007857772	0.673491982	0.010815606	0.620802
		Left z-score	0.004188559	0.758576347	0.004911273	0.73923038
		Right SBR	0.006918718	0.692630249	0.009380222	0.645120875
		Left SBR	0.003731763	0.771759467	0.003612744	0.775335842

Tabella 4: Correlazione tra la percentuale di mini-epoche (*% mini epeches*) nelle 5 fasi del sonno con i valori SBR e gli z scores ottenuti tramite la ¹¹C-PE2I PET nel putamen e nello striato.

			<i>Striatum</i>		<i>Putamen</i>	
			<i>R square</i>	<i>Significance F</i>	<i>R square</i>	<i>Significance F</i>
<i>Duration</i>	<i>REM</i>	Right z-score	0.050028482	0.234768941	0.042525874	0.274256666
		Left z-score	0.038706811	0.297397112	0.0336573	0.331837224
		Right SBR	0.063105534	0.225789123	0.054266886	0.262443075
		Left SBR	0.050033857	0.282443347	0.043166578	0.318971232
	<i>NREM</i>	Right z-score	0.185979804	0.031367608	0.150511988	0.05532562
		Left z-score	0.160119757	0.047477257	0.132285688	0.073899374
		Right SBR	0.182974907	0.032923683	0.154470322	0.05194862
		Left SBR	0.155262341	0.051297694	0.13435194	0.071515208
	<i>S1</i>	Right z-score	0.035596858	0.366414536	0.010657155	0.623386044
		Left z-score	0.037199208	0.355643829	0.013970752	0.57363107
		Right SBR	0.059131261	0.241484884	0.027568201	0.427655261
		Left SBR	0.055462184	0.257102506	0.028204092	0.42229996
	<i>S2</i>	Right z-score	0.21837238	0.018508473	0.196404353	0.026500987
		Left z-score	0.18949449	0.029637654	0.17608216	0.036780737
		Right SBR	0.184695479	0.032023784	0.174360056	0.037810834
		Left SBR	0.164348109	0.044379663	0.160355381	0.047299209
	<i>S3</i>	Right z-score	0.001015324	0.879816318	0.000557045	0.910837191
		Left z-score	0.00020986	0.945206265	4.43723E-06	0.992026772
		Right SBR	0.003597117	0.775810079	0.001847847	0.838335448
		Left SBR	0.00089195	0.88730601	0.000118893	0.958744518

Tabella 5: Correlazione tra la durata (duration) nelle 5 fasi del sonno con i valori SBR e gli z scores ottenuti tramite la ¹¹C-PE2I PET nel putamen e nello striato.

			<i>Striatum</i>		<i>Putamen</i>	
			<i>R square</i>	<i>Significance F</i>	<i>R square</i>	<i>Significance F</i>
<i>% Duration</i>	<i>REM</i>	Right z-score	0.013049785	0.547786189	0.026193532	0.439576658
		Left z-score	0.021832367	0.48090394	0.016960323	0.534946013
		Right SBR	0.022914344	0.470107803	0.020567484	0.494034732
		Left SBR	0.016038539	0.546352097	0.012632139	0.592723647
	<i>NREM</i>	Right z-score	0.158819027	0.048472027	0.120137094	0.08962209
		Left z-score	0.141779498	0.06356098	0.113592269	0.09945355
		Right SBR	0.178433291	0.035418278	0.143160908	0.062181736
		Left SBR	0.15130663	0.054630773	0.123964451	0.084335376
	<i>S1</i>	Right z-score	0.133236873	0.072792126	0.084679532	0.158169492
		Left z-score	0.133835541	0.072103755	0.094054359	0.135932214
		Right SBR	0.166884259	0.042617489	0.119667488	0.090293443
		Left SBR	0.15542852	0.05116214	0.116032861	0.095665146
	<i>S2</i>	Right z-score	0.198439315	0.025639897	0.161994805	0.04607837
		Left z-score	0.173780778	0.038163597	0.150172645	0.055624995
		Right SBR	0.197077693	0.02621303	0.169529292	0.04085244
		Left SBR	0.168300337	0.041663479	0.150108872	0.055681435
	<i>S3</i>	Right z-score	0.004308901	0.755234884	0.001241503	0.867207272
		Left z-score	0.001802513	0.840305624	0.000140154	0.955210625
		Right SBR	0.008473505	0.661657479	0.003499233	0.778806251
		Left SBR	0.003342458	0.783700294	0.000454034	0.9194734

Tabella 6: Correlazione tra la percentuale di durata (% duration) nelle 5 fasi del sonno con i valori SBR e z scores ottenuti tramite la ¹¹C-PE2I PET nel putamen e nello striato.

		<i>Ratio Putamen/Caudatus Right</i>		<i>Ratio Putamen/Caudatus Left</i>	
		R Square	Significance F	R Square	Significance F
REM	% mini epechs	0.000162575	0.946683327	0.0044176	0.72711828
	duration	1.62274E-05	0.984753	0.000343134	0.929968143
	% duration	0.000424459	0.922132163	0.00061211	0.906552052
S1	% mini epechs	0.05346783	0.266086183	0.039504251	0.340866403
	duration	0.126715919	0.080730228	0.134339373	0.071529474
	% duration	0.048684664	0.289198549	0.053919	0.264021892
S2	% mini epechs	4.43651E-05	0.974792021	0.000614559	0.906366066
	duration	0.003659555	0.773921741	0.005861216	0.716059742
	% duration	0.00086088	0.889274206	0.000622152	0.905791922
S3	% mini epechs	0.005857172	0.716153732	3.03221E-05	0.979159
	duration	0.001847847	0.838335448	0.000118893	0.958744518
	% duration	0.019632594	0.504119477	0.046357199	0.301319696
NREM	% mini epechs	0.004985904	0.737324426	0.010502961	0.625923389
	duration	0.003786049	0.770148646	0.004370957	0.75353168
	% duration	0.010527211	0.625522839	0.014141184	0.571286151

Tabella 7: Correlazione tra la percentuale di mini-epoche, la durata e la percentuale di durata nelle 5 fasi del sonno con i valori ottenuti tramite la ¹¹C-PE2I PET del rapporto Striato/Caudato destro e sinistro.

6. DISCUSSIONE

I risultati del primo step del presente studio suggeriscono che la metodica semi-automatica di quantificazione del sonno REM senza atonia (RSWA), sviluppata da Frandsen *et al.*⁶⁶, ha una buona accuratezza nel riconoscimento del disturbo comportamentale del sonno REM, anche quando applicata ad un campione indipendente di soggetti. Tuttavia, l'entità dell'attività muscolare eccessiva in sonno REM non è risultata correlata in maniera statisticamente significativa con la funzionalità dopaminergica nigro-striatale, studiata mediante ¹²³I-FP-CIT-SPECT.

Nel secondo step, sono stati indagati i valori dell'attività muscolare all'EMG, quantificati dal sistema semi-automatico di Frandsen *et al.*⁶⁶ durante le fasi del sonno REM e NREM in rapporto alla funzione nigro-striatale dopaminergica, quantificata attraverso la ¹¹C-PE2I PET.

Durante la fase S2 del sonno non-REM è stato osservato un valore della significatività F inferiore al 0.05, sia nel putamen che nel caudato, in relazione alla durata e alla percentuale della durata. Ulteriori valori della significatività F inferiore al 0.05 sono stati rilevati dall'associazione del sonno NREM con la durata e la percentuale della durata, unicamente a livello dello striato. Tuttavia, questi valori non si sono mostrati statisticamente significativi dopo correzione per confronti multipli. Inoltre, il risultato appare anche nella direzione opposta a quella attesa, cioè correlati positivamente, secondo il paradosso di Berkson.

Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che l'eccessiva attività motoria in sonno REM, nei pazienti affetti da RBD, sia idiopatico che con concomitante PD, non dipenda dalla deafferentazione dopaminergica nigro-striatale. Questo risultato è stato ottenuto

preliminarmente utilizzando la metodica di neuroimaging più diffusa ed utilizzata al mondo, ovvero la ^{123}I -FP-CIT-SPECT. Tuttavia, questa metodica, seppur valida nella pratica clinica e nella ricerca, ha alcuni limiti. In primo luogo, ha un'affinità non selettiva per il DAT, in quanto presenta affinità anche per il trasportatore della serotonina e della noradrenalina^{86,92}. Inoltre, essendo una metodica SPECT, ha una risoluzione spaziale limitata (intorno ai 10 mm), e pertanto inferiore rispetto alle metodiche PET, che hanno generalmente una migliore risoluzione spaziale (intorno ai 5 mm).

Viceversa, nella seconda parte dello studio, è stata utilizzata la ^{11}C -PE2I-PET. Tale metodica è stata sviluppata per superare i limiti della ^{123}I -FP-CIT-SPECT. Infatti, la ^{11}C -PE2I PET ha un'elevata affinità selettiva per il DAT, ed essendo una metodica PET, ha una superiore risoluzione spaziale. Questa nuova metodica potrebbe rappresentare un valido strumento per la quantificazione della deafferentazione dopaminergica nigro-striatale nei pazienti affetti da sinucleinopatie, sin dalle fasi precoci e prodromiche della malattia conclamata, come nei pazienti affetti da iRBD. Questo potrebbe permettere una più accurata quantificazione della severità della malattia e, conseguentemente, lo studio e il follow-up di farmaci neuroprotettivi. Tuttavia, questo tracciante per il momento è esclusivamente utilizzato a scopo di ricerca, soprattutto perché marcato con ^{11}C , caratterizzato da una breve emivita^{86,87}, e quindi poco utilizzabile nei centri più periferici che non hanno la possibilità di sintetizzare il tracciante in situ⁸⁷.

La mancata correlazione tra attività motoria in REM e funzionalità dopaminergica nigro-striatale è in linea con un recente studio⁹³, in cui la quantificazione dell'RSWA tramite la metodica semi-automatica di Ferri *et al.* non ha mostrato correlazioni

statisticamente significative quando confrontata con l'esame SPECT dopaminergico presinaptico. Questi risultati sembrano suggerire che l'attività muscolare dei pazienti con RBD durante il sonno REM non sia influenzata dal pathway dopaminergico nigrostriatale e che quindi esista una diversa patogenesi dopaminergica in questo disturbo.

Una possibile spiegazione è che, sebbene la neurodegenerazione dovuta dalla sinucleinopatia determini sia l'RBD che i sintomi motori tipici del PD, questa avvenga deteriorando diverse strutture troncali. Infatti, è noto che il parkinsonismo, nel PD, sia dovuto alla degenerazione della sostanza nera mesencefalica⁹⁴. Viceversa, è stata ipotizzato che l'RBD sia dovuto ad una degenerazione del complesso subcoeruleus⁶. In effetti, è stato dimostrato che tale area è alterata nei soggetti affetti da iRBD³⁹ e da PD con RBD⁴⁰. A dimostrazione di questo, in entrambi questi studi l'entità dell'attività motoria in REM è risultata significativamente correlata con l'entità del danno a carico del complesso subcoeruleus^{39,40}.

7. CONCLUSIONI

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa che impatta severamente sulla qualità di vita dei pazienti e delle loro famiglie. Date le sue iniziali manifestazioni polimorfe e la carenza di trattamenti efficaci in grado di contrastare la progressione degenerativa intrinseca della malattia, individuare e trattare i soggetti a maggior rischio di sviluppare tale disturbo, prima che compaiano i sintomi motori, costituisce un'importante sfida per i medici e i ricercatori. Essendo l'iRBD una manifestazione del disturbo nella sua fase prodromica e uno dei principali fattori di rischio alla fenocconversione, tecniche semi-automatizzate standardizzate dell'attività muscolare in sonno tipica della malattia, in grado di ridurre costi, tempi di attesa e disomogeneità operatore-dipendenti, rappresentano il futuro del processo diagnostico e, di conseguenza, di screening attuabile su larga scala. Nel nostro studio abbiamo suggerito che tale attività motoria in sonno REM non dipende dalla funzionalità dopaminergica nigro-striatale. Tale risultato conferma la teoria che la degenerazione dovuta a sinucleinopatia colpisca diversi sistemi cortico-sottocorticali, in maniera eterogenea. Ulteriori studi sono necessari per approfondire meglio la progressione della degenerazione delle sinucleinopatie fin dalle fasi precoci, premotorie.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Hu, M. T. REM sleep behavior disorder (RBD). *Neurobiol. Dis.* **143**, 104996 (2020).
2. Peever, J. & Fuller, P. M. The Biology of REM Sleep. *Curr. Biol.* **27**, R1237–R1248 (2017).
3. Miglis MG, Adler CH, Antelmi E, Arnaldi D, Baldelli L, Boeve BF, Cesari M, Dall'Antonia I, Diederich NJ, Doppler K, Dušek P, Ferri R, Gagnon JF, Gan-Or Z, Hermann W, Högl B, Hu MT, Iranzo A, Janzen A, Kuzkina A, Lee JY, Leenders KL, Lewis SJG, Liguori C, Liu J, Lo C, Ehgoetz Martens KA, Nepozitek J, Plazzi G, Provini F, Puligheddu M, Rolinski M, Rusz J, Stefani A, Summers RLS, Yoo D, Zitser J, Oertel WH. Biomarkers of conversion to α -synucleinopathy in isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder. *Lancet Neurol.* 2021 Aug;20(8):671-684.
4. Iranzo, A., Santamaria, J. & Tolosa, E. The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior disorder in neurodegenerative diseases. *Sleep Med. Rev.* **13**, 385–401 (2009).
5. Arnulf, I. REM sleep behavior disorder: Motor manifestations and pathophysiology. *Mov. Disord.* **27**, 677–689 (2012).
6. McKenna, D. & Peever, J. Degeneration of Rapid Eye Movement Sleep Circuitry Underlies Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder. *Mov. Disord.* **00**, 9 (2017).
7. Schenck, C. H. & Mahowald, M. W. REM Sleep Behavior Disorder: Clinical, Developmental, and Neuroscience Perspectives 16 Years After its Formal Identification in SLEEP. *Sleep* **25**, 120–138 (2002).
8. Dijkstra, F. *et al.* Polysomnographic phenotype of isolated REM sleep without atonia. *Clin. Neurophysiol.* **131**, 2508–2515 (2020).
9. Boeve, B. F. REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and futu. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1184**, 15–54 (2010).
10. Iranzo, A., Santamaria, J. & Tolosa, E. Idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder: diagnosis, management, and the need for neuroprotective interventions. *Lancet Neurol.* **15**, 405–419 (2016).

11. Schenck, C. H., Garcia-Rill, E., Segall, M., Noreen, H. & Mahowald, M. W. HLA Class II genes associated with REM sleep behavior disorder. *Ann. Neurol.* **39**, 261–263 (1996).
12. Yin, D., Chen, S. & Liu, J. Sleep Disturbances in Autoimmune Neurologic Diseases: Manifestation and Pathophysiology. *Front. Neurosci.* **15**, 687536 (2021).
13. Vale, T. C., Fernandes do Prado, L. B., Fernandes do Prado, G., Barsottini, O. G. P. & Pedroso, J. L. Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder in Paraneoplastic Cerebellar Degeneration: Improvement with Immunotherapy. *Sleep* **39**, 117–120 (2016).
14. Iranzo, A. *et al.* Rapid eye movement sleep behavior disorder and potassium channel antibody-associated limbic encephalitis. *Ann. Neurol.* **59**, 178–181 (2006).
15. Caminero, A. & Bartolomé, M. Sleep disturbances in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **309**, 86–91 (2011).
16. Foschi, M. *et al.* Sleep-related disorders and their relationship with MRI findings in multiple sclerosis. *Sleep Med.* **56**, 90–97 (2019).
17. Cochen, V. *et al.* Vivid dreams, hallucinations, psychosis and REM sleep in Guillain–Barré syndrome. *Brain* **128**, 2535–2545 (2005).
18. Sabater, L. *et al.* A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *Lancet Neurol.* **13**, 575–586 (2014).
19. Xi, Z. & Luning, W. REM sleep behavior disorder in a patient with pontine stroke. *Sleep Med.* **10**, 143–146 (2009).
20. Kimura, K. *et al.* A discrete pontine ischemic lesion could cause REM sleep behavior disorder. *Neurology* **55**, 894–895 (2000).
21. Provini, F. *et al.* Status dissociatus after surgery for tegmental ponto-mesencephalic cavernoma: A state-dependent disorder of motor control during sleep. *Mov. Disord.* **19**, 719–724 (2004).
22. Plazzi, G. & Montagna, P. Remitting REM sleep behavior disorder as the initial sign of multiple sclerosis. *Sleep Med.* **3**, 437–439 (2002).
23. Hirano, S. *et al.* Brain acetylcholinesterase activity in FTDP-17 studied by PET. *Neurology* **66**, 1276–1277 (2006).

24. Gómez-Choco, M. J. *et al.* Prevalence of restless legs syndrome and REM sleep behavior disorder in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **13**, 805–808 (2007).
23. Zambelis T, Paparrigopoulos T, Soldatos CR. REM sleep behaviour disorder associated with a neurinoma of the left pontocerebellar angle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002 Jun;72(6):821-2.
26. Limousin, N. *et al.* A brainstem inflammatory lesion causing REM sleep behavior disorder and sleepwalking (parasomnia overlap disorder). *Sleep Med.* **10**, 1059–1062 (2009).
27. Plazzi, G., Montagna, P., Meletti, S. & Lugaresi, E. Polysomnographic study of sleeplessness and oneiricisms in the alcohol withdrawal syndrome. *Sleep Med.* **3**, 279–282 (2002).
28. Manni, R., Ratti, P.-L. & Terzaghi, M. Secondary “incidental” REM sleep behavior disorder: Do we ever think of it? *Sleep Med.* **12**, S50–S53 (2011).
29. Haba-Rubio, J. *et al.* Prevalence and Determinants of REM Sleep Behavior Disorder in the General Population. 25 (2018).
30. Schenck, C. H. & Mahowald, M. W. REM SLEEP PARASOMNIAS. 24.
31. Krenzer, M. *et al.* Brainstem and Spinal Cord Circuitry Regulating REM Sleep and Muscle Atonia. *PLoS ONE* **6**, e24998 (2011).
32. Boeve, B. F. *et al.* Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* **130**, 2770–2788 (2007).
33. Peever, J., Luppi, P.-H. & Montplaisir, J. Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder. *Trends Neurosci.* **37**, 279–288 (2014).
34. Iranzo, A. *et al.* Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* **12**, 443–453 (2013).
35. Benarroch, E. E. New findings on the neuropathology of multiple system atrophy. *Auton. Neurosci.* **96**, 59–62 (2002).
36. Turner, R. S., D’Amato, C. J., Chervin, R. D. & Blaivas, M. The pathology of REM sleep behavior disorder with comorbid Lewy body dementia. *Neurology* **55**, 1730–1732 (2000).
37. Schenck, C. H. *et al.* Lewy body variant of alzheimer’s disease (AD) identified by postmortem ubiquitin staining in a previously reported case of AD associated with REM sleep behavior disorder. *Biol. Psychiatry* **42**, 527–528 (1997).

38. Eiseensehr, I. *et al.* Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Brain* **123**, 1155–1160 (2000).
39. Ehrminger, M. *et al.* The coeruleus/subcoeruleus complex in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Brain* **139**, 1180–1188 (2016).
40. Garcia-Lorenzo, D. *et al.* The coeruleus/subcoeruleus complex in rapid eye movement sleep behaviour disorders in Parkinson's disease. 10.
41. Teman, P. T., Tippmann-Peikert, M., Silber, M. H., Slocumb, N. L. & Auger, R. R. Idiopathic rapid-eye-movement sleep disorder: Associations with antidepressants, psychiatric diagnoses, and other factors, in relation to age of onset. *Sleep Med.* **6** (2009).
42. Olson, E. J., Boeve, B. F. & Silber, M. H. Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases. *Brain* **123**, 331–339 (2000).
43. Postuma, R. B. *et al.* Environmental risk factors for REM sleep behavior disorder: A multicenter case-control study. *Neurology* **79**, 428–434 (2012).
44. Ascherio, A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **15**, 16 (2016).
45. Noyce, A. J., Lees, A. J. & Schrag, A.-E. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **8**.
46. Brockmann, K. & Srujijes, K. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. **6** (2011).
47. McNeill, A., Duran, R., Hughes, D. A., Mehta, A. & Schapira, A. H. V. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous *glucocerebrosidase* mutation carriers. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 853–854 (2012).
48. Gan-Or, Z. *et al.* GBA mutations are associated with Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder. **5** (2015).
49. Martin, I. *et al.* Ribosomal protein s15 phosphorylation mediates LRRK2 neurodegeneration in Parkinson's disease. **26** (2015).
50. Pont-Sunyer, C. *et al.* Sleep Disorders in Parkinsonian and Nonparkinsonian LRRK2 Mutation Carriers. *PLOS ONE* **20** (2015).
51. Arnaldi, D. Idiopathic REM sleep behavior disorder and neurodegenerative risk: to tell or not to tell to the patient? How to minimize the risk? **55**.

52. Berg, D. *et al.* MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease: MDS Criteria for Prodromal PD. *Mov. Disord.* **30**, 1600–1611 (2015).
53. Postuma, R. B. *et al.* Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study. *Brain* **142**, 744–759 (2019).
54. Postuma, R. B., Gagnon, J.-F. & Montplaisir, J. Y. REM sleep behavior disorder: From dreams to neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **46**, 553–558 (2012).
55. Lam, S.-P., Li, S. X., Zhang, J. & Wing, Y.-K. Development of scales for assessment of rapid eye movement sleep behavior disorder (RBD). *Sleep Med.* **14**, 734–738 (2013).
56. Stiasny-Kolster, K. *et al.* The REM sleep behavior disorder screening questionnaire-A new diagnostic instrument. *Mov. Disord.* **22**, 2386–2393 (2007).
57. Sateia, M. J. International Classification of Sleep Disorders-Third Edition. *Chest* **146**, 1387–1394 (2014).
58. Stefani, A. *et al.* Long-Term Follow-up Investigation of Isolated Rapid Eye Movement Sleep Without Atonia Without Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder: A Pilot Study. *J. Clin. Sleep Med.* **11**, 1273–1279 (2015).
59. Iranzo, A. & Santamaría, J. Severe Obstructive Sleep Apnea/Hypopnea Mimicking REM Sleep Behavior Disorder. *Sleep* **28**, 203–206 (2005).
58. Di Fabio N, Poryazova R, Oberholzer M, Baumann CR, Bassetti CL. Sleepwalking, REM sleep behaviour disorder and overlap parasomnia in patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 2013;70(5-6):297-303.
61. Malow, B. A. Paroxysmal Events in Sleep: *J. Clin. Neurophysiol.* **19**, 522–534 (2002).
62. Burns, J. W. *et al.* EMG Variance During Polysomnography As An Assessment For REM Sleep Behavior Disorder. *Sleep* **30**, 1771–1778 (2007).
63. Diagnosis of REM Sleep Behavior Disorder by Video-Polysomnographic Study: Is One Night Enough? *Sleep* (2008) doi:10.5665/sleep/31.8.1179.
64. Frauscher, B. *et al.* Normative EMG Values during REM Sleep for the Diagnosis of REM Sleep Behavior Disorder. *Sleep* **35**, 835–847 (2012).
65. Frauscher, B., Ehrmann, L. & Högl, B. Defining muscle activities for assessment of rapid eye movement sleep behavior disorder: From a qualitative to a quantitative diagnostic level. *Sleep Med.* **14**, 729–733 (2013).

66. Frandsen, R., Nikolic, M., Zoetmulder, M., Kempfner, L. & Jennum, P. Analysis of automated quantification of motor activity in REM sleep behaviour disorder. *J. Sleep Res.* **24**, 583–590 (2015).
67. Ferri, R., Gagnon, J.-F., Postuma, R. B., Rundo, F. & Montplaisir, J. Y. Comparison between an automatic and a visual scoring method of the chin muscle tone during rapid eye movement sleep. *Sleep Med.* **15**, 661–665 (2014).
68. Mayer, G. *et al.* Quantification of Tonic and Phasic Muscle Activity in REM Sleep Behavior Disorder. *J. Clin. Neurophysiol.* **25**, 48–55 (2008).
69. Ferri, R. *et al.* Improved computation of the atonia index in normal controls and patients with REM sleep behavior disorder. *Sleep Med.* **11**, 947–949 (2010).
70. Guttowski, D., Mayer, G., Oertel, W. H., Kesper, K. & Rosenberg, T. Validation of semiautomatic scoring of REM sleep without atonia in patients with RBD. *Sleep Med.* **46**, 107–113 (2018).
71. Kempfner, J., Sorensen, G., Zoetmulder, M., Jennum, P. & Sorensen, H. B. D. REM Behaviour Disorder detection associated with neurodegenerative diseases. in *2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology* 5093–5096 (IEEE, 2010). doi:10.1109/IEMBS.2010.5626212.
72. Arnaldi, D. *et al.* Functional imaging in pre-motor Parkinson’s disease. **58**, 11 (2014).
73. Booij, J. & Knol, R. J. J. SPECT imaging of the dopaminergic system in (pre-motor) Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13**, S425–S428 (2007).
74. Bauckneht, M. *et al.* Presynaptic dopaminergic neuroimaging in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* **41**, 266–274 (2018).
75. Unger, M. M. *et al.* Assessment of idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder by transcranial sonography, olfactory function test, and FP-CIT-SPECT. *Mov. Disord.* **23**, 596–599 (2008).
76. Rupperecht, S. *et al.* Clinical markers of early nigrostriatal neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Sleep Med.* **14**, 1064–1070 (2013).
77. Stiasny-Kolster, K. Combination of ‘idiopathic’ REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for -synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. *Brain* **128**, 126–137 (2004).

78. Albin, R. L. *et al.* Decreased striatal dopaminergic innervation in REM sleep behavior disorder. *Neurology* **55**, 1410–1412 (2000).
79. Iranzo, A. *et al.* Serial dopamine transporter imaging of nigrostriatal function in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study. *Lancet Neurol.* **10**, 797–805 (2011).
80. Kim, Y. K. *et al.* The implication of nigrostriatal dopaminergic degeneration in the pathogenesis of REM sleep behavior disorder: Nigrostriatal dopaminergic degeneration in RBD. *Eur. J. Neurol.* **17**, 487–492 (2010).
81. Arnaldi, D. *et al.* The Role of the Serotonergic System in REM Sleep Behavior Disorder. *Sleep* **38**, 1505–1509 (2015).
82. Djang, D. S. W. *et al.* SNM Practice Guideline for Dopamine Transporter Imaging with ¹²³I-Ioflupane SPECT 1.0. *J. Nucl. Med.* **53**, 154–163 (2012).
83. Arnaldi, D. *et al.* Nigro-caudate dopaminergic deafferentation: a marker of REM sleep behavior disorder? *Neurobiol. Aging* **36**, 3300–3305 (2015).
84. Li, Y. *et al.* Predictive markers for early conversion of iRBD to neurodegenerative synucleinopathy diseases. *Neurology* **88**, 1493–1500 (2017).
85. Iranzo, A. *et al.* Dopamine transporter imaging deficit predicts early transition to synucleinopathy in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: DAT-SPECT in REM Sleep Behavior Disorder. *Ann. Neurol.* **82**, 419–428 (2017).
86. Li, W. *et al.* ¹¹C-PE2I and ¹⁸F-Dopa PET for assessing progression rate in Parkinson's: A longitudinal study: Comparison of ¹⁸F-dopa and ¹¹C-PE2I PET. *Mov. Disord.* **33**, 117–127 (2018).
87. Appel, L. *et al.* Use of ¹¹C-PE2I PET in Differential Diagnosis of Parkinsonian Disorders. *J. Nucl. Med.* **56**, 234–242 (2015).
88. Postuma, R. B. *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease: MDS-PD Clinical Diagnostic Criteria. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601 (2015).
89. Calvini, P. *et al.* The basal ganglia matching tools package for striatal uptake semi-quantification: description and validation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34**, 1240–1253 (2007).
90. Nobili, F. *et al.* Automatic semi-quantification of [123I]FP-CIT SPECT scans in healthy volunteers using BasGan version 2: results from the ENC-DAT database. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **40**, 565–573 (2013).

91. Morbelli, S. *et al.* EANM practice guideline/SNMMI procedure standard for dopaminergic imaging in Parkinsonian syndromes 1.0. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **47**, 1885–1912 (2020).
92. Abi-Dargham, A. *et al.* SPECT Imaging of Dopamine Transporters in Human Brain with Iodine- 123-Fluoroalkyl Analogs of n-CIT. 5.
93. Puligheddu, M. *et al.* REM Sleep without atonia correlates with abnormal vestibular-evoked myogenic potentials in isolated REM sleep behavior disorder. *Sleep* **42**, zsz128 (2019).
94. Bloem, B. R., Okun, M. S. & Klein, C. Parkinson's disease. *The Lancet* **397**, 2284–2303 (2021).

9. RINGRAZIAMENTI

Questo percorso di sette anni mi ha dato l'opportunità sia di fallire un milione di volte sia di scoprire e raggiungere i miei sogni più improbabili. Sono talmente tante le persone che mi hanno ispirata e aiutata, che ci vorrebbero diverse decine di pagine solo per citarle.

Vorrei ringraziare profondamente il professor Dario Arnaldi, che non solo mi ha permesso di vivere una delle esperienze più importanti della mia vita a Copenhagen seguendomi attivamente durante la ricerca, ma mi ha anche dato un esempio, un modello a cui fare riferimento quando anch'io inizierò la professione. Personalmente credo che il professor Arnaldi sia uno dei diamanti dell'università di Medicina e Chirurgia di Genova. Ringrazio molto anche lo specializzando di neurologia Andrea Donniaquio, che ha sostenuto costantemente me e gli altri tesisti come farebbe un fratello maggiore, dimostrando grande passione per il suo lavoro. Sono stata incredibilmente fortunata a trovare una squadra di lavoro per la tesi così accogliente ed inclusiva, e, insieme agli altri tesisti, abbiamo formato un gruppo che mi ha dato molta forza e coraggio.

Una delle lezioni più preziose che ho imparato è stata infatti proprio quella della forza del gruppo: a Pavia, Genova e Copenhagen non ho trovato solo amici, ma anche una grande famiglia.

I miei amici e compagni a Genova sono stati la benedizione più grande che potessi mai sperare di trovare al mio fianco durante questo faticoso e lungo percorso. C'è qualcosa che ci unisce magneticamente, abbiamo inconsciamente creato un potentissimo legame di cui non ci libereremo facilmente.

Ci siamo tenuti per mano quando dovevamo preparare gli esami più complicati e abbiamo pianto insieme quando ci sentivamo inadatti e incompleti. Abbiamo tutti vissuto l'amarezza dell'inadeguatezza e portiamo tutti il segno lasciato dal sentimento del "non sono abbastanza". Ci siamo incoraggiati e motivati a vicenda quando eravamo stanchi e scettici e abbiamo celebrato insieme le nostre vittorie. Quando non avevamo un letto in cui dormire a Genova, ci siamo ospitati nelle proprie case come se facessimo tutti parte della stessa famiglia e abbiamo trovato forza l'uno nell'altro anche durante i momenti più difficili, come quando non potevamo smettere di studiare per salutare per sempre e seppellire i nostri cari. Per tutto questo non potrò mai ringraziare abbastanza Klaudia Eshja, Daniele Macchi, Riccardo Caldonazzo, Silvia Mambriani, Sonia Lerta, Thoma Dario Clementi, Benedetta Barbieri, Federico Del Fante, Kristian Perndojaj, Davide Ghisio, Stephane Rwendeye, Arianna Corti, Michele Scarzella e tanti altri.

In particolare, vorrei ringraziare Klaudia, Daniele, Riccardo e Thoma, che in tutti questi anni mi hanno aiutata a crescere e a scoprire le versioni migliori di me. Sono sempre state le prime persone da chiamare dopo ogni esame, le prime persone che cercavo quando ero in difficoltà e non sapevo cosa fare. Per fortuna avevo sempre al

mio fianco Klaudia a darmi sempre il ritmo e ad offrirmi una mano quando ero nei guai; Daniele a dirmi sempre la verità anche quando era scomoda; Riccardo a farmi sentire sempre amata; Thoma a ricordarmi che tutto è un po' più facile quando considerato con le giuste misure.

Durante l'ultimo anno ho potuto conoscere e crescere al fianco di due donne straordinarie: Silvia e Benedetta. Ho avuto il grande onore di lavorare vicino alla brillante Silvia, che per me è stata tutor e mentore, oltre a diventare una delle più preziose amiche. Grazie a lei ho conosciuto Benedetta, che senza esitare mi ha accolta in casa e mi ha aiutata durante i momenti più critici dell'ultimo anno.

Un grazie speciale anche ad Andrea Caviglia, il rappresentante più in gamba e gentile che il nostro corso ha avuto la fortuna di avere, e a tutti gli altri rappresentanti Daniele, Klaudia, Gabriella, Margherita, Angelica, Anas, Yasmine e Margherita, che hanno provato insieme a me a rendere migliore il corso di Medicina a Genova. Insieme, ci siamo esposti, ci siamo confrontati e ci siamo uniti sotto un'unica causa. Nonostante l'università non riconosca il nostro lavoro, credo che insieme abbiamo fatto qualcosa di eccezionale, specialmente durante la pandemia da Covid, coordinando le comunicazioni tra studenti, professori e coordinatori di corso. A tal proposito, vorrei ringraziare il coordinatore di corso Gianluca Damonte, uno dei professori più preziosi dell'università di Genova. Non solo ha sempre risposto alle domande mie e di tantissimi altri studenti in pochissime ore, ma si è sempre mostrato disponibile in qualsiasi momento per tutti coloro che cercassero aiuto.

Durante gli studi di Farmacia a Pavia, sono estremamente grata di aver conosciuto Annalisa e Marta, senza le quali non sarei nemmeno entrata a Medicina: tra biscotti e risate, nella gelida nebbia pavese, mi hanno insegnato chimica, matematica e fisica. Ma soprattutto, mi hanno insegnato a ragionare con la testa.

In Danimarca ho avuto l'immensa fortuna di conoscere innumerevoli italiani determinati e talentuosi, tutti con storie diverse alle spalle. In particolare, uno speciale ringraziamento a Davide Broll che, oltre ad essere stata la figura di riferimento durante la mia permanenza, mi ha mostrato i trucchi e i segreti delle dinamiche sociali efficaci in ambito lavorativo. Uno speciale grazie anche alla fortissima Chiara Pipinato, che rappresenta il fuoco con cui ho condiviso e alimentato i miei ideali e sogni più profondi.

Un grandissimo grazie anche ai miei amici di Trento, che non mi hanno mai scordata anche se lontana e mi hanno sempre sostenuta. In particolare, Angela, una delle mie amiche più speciali e che stimo molto, ha sempre portato tanta pazienza ed è sempre stata pronta ad ascoltarmi. Grazie anche a mio cugino Nicolò, uno dei ragazzi più coraggiosi che conosca, che è sempre riuscito a trovare il tempo da dedicarmi ogni volta che tornavo a casa.

Grazie a Simone Caboni, il mio fratello sardo, per avermi dimostrato che la determinazione e l'ambizione sono tutto ciò che ci vuole per avverare qualsiasi sogno.

Grazie anche a tutti gli specializzandi che, durante i vari tirocini che ho svolto in ospedale, hanno sempre risposto a tutte le mie innumerevoli domande dandomi la possibilità di capire e imparare.

Una buona parte del mio percorso è stata resa indimenticabile anche grazie ad alcuni ambienti extra-universitari che ho frequentato. Mi riferisco a Red Yoga, dove ho imparato a conoscere il mio corpo e il mio respiro; Guitar Lab, dove ho conosciuto Francesca Giglio, che mi ha introdotto al mondo del canto e mi ha aiutata a raggiungere obiettivi che consideravo impossibili fino ad allora; la comunità di Sant'Egidio, che mi ha fatto entrare in contatto con la realtà dei rifugiati e mi ha fatto conoscere Klaudia; Copenhagen Music Institute, dove, con Caroline, ho imparato per la prima volta il vero significato di arte e ho capito l'eccezionalità della comunicazione fatta col cuore, ottenendo risultati incredibili. La musica infatti ha rappresentato per me un'enorme ancora di salvezza, facendomi sentire emozioni indescrivibili e dandomi ogni giorno un'energia esplosiva, necessaria per me per tenere duro e andare avanti. Grazie alla musica, all'arte e alla poesia, sono stata in grado di trasformare le mie più grandi insicurezze, la rabbia e la delusione in punti di straordinaria forza.

Grazie a Madre Natura, sarebbe impossibile per me non citare ciò che più mi ha dato sollievo nei momenti di solitudine e ha sempre rappresentato una garanzia di pace, nell'agitazione della vita frenetica.

Ultimi, ma non in ordine di importanza, ringrazio i Brandini, che hanno sempre creduto in me, e la mia famiglia, che ha reso tutto questo possibile non solo finanziando i miei studi, le mie attività e i miei viaggi, ma anche sostenendomi incondizionatamente. Grazie alla nonna Vittorina, l'unica donna più polemica di me nel Triveneto, che mi ricorda sempre quanto sono amata e quanto è bello sorridere delle cose più piccole. Grazie alla Lucia, che mi ha sempre ispirato con le sue idee anticonformiste, con la sua lotta al cambiamento climatico e mi ha sempre dato un'altra prospettiva della realtà. Grazie al papà che si è sempre preoccupato di fornirmi tutto il materiale necessario al mio studio, insegnandomi il valore dei libri e dell'istruzione. Rivolgo inoltre un pensiero ad alcune persone della famiglia molto importanti con le quali avrei voluto festeggiato insieme questo traguardo: nonno Armando, Valerio Floriani e Franco Frizzera. Tre uomini veramente molto speciali che hanno riempito la nostra famiglia di amore e risate.

Grazie alla Susi e alla mamma, ultima in questi ringraziamenti perché niente potrebbe essere aggiunto dopo di lei: la mia stella polare, la mia fan e complice numero uno. Con lei ho avuto l'immenso piacere di fare i litigi migliori, più divertenti e costruttivi; i pianti più disperati durante le sessioni d'esami, a casa e al telefono; le chiacchierate più importanti davanti al thè di prima mattina a colazione. Grazie mamma per avermi insegnato a non guardare la montagna, ma un gradino alla volta.

Lettera ai ribelli che verranno

Salutate l'ardore

il braccio che vola,

il vento, la passione.

Disobbedite

alla vita e alla morte,

a voi stessi e agli altri,

Sia febbrile la vostra giornata,

non sia mai opportunistica,

sia chiara nell'impeto,

bella e nervosa come una mattina d'aprile.

Io aspetto il vostro aprile,

siate pieni di ebbrezza e di furore,

date gloria al mondo che c'è fuori.

Non vi servono nascondigli

ma comunità dove trovarvi.

Portate il mondo

sul palmo della mano,

andate sull'orlo,

dietro le montagne,

su una spiaggia rovinata,

Nessuno può fermare

il vostro incendio,

perché lo fermate voi,

perché siete in silenzio?

- Franco Arminio -