

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)

**“Studio dell’analisi semi-automatica dell’attività muscolare nel
disturbo comportamentale del sonno REM”**

RELATORE

Prof. Dario Arnaldi

CANDIDATO

Giorgio Belluscio

Anno Accademico 2020-2021

Indice

1. Introduzione	3
1.1 Disturbo comportamentale del sonno REM (RBD)	3
1.2 Neurofisiologia del sonno REM e fisiopatologia dell'RBD	4
1.3 Epidemiologia e fattori di rischio	7
1.4 Rischio di sinucleinopatia	9
1.5 Diagnosi di RBD.....	10
1.5.1 Manifestazione clinica.....	11
1.5.2 Registrazione elettromiografica alla polisonnografia	13
1.5.3 Analisi semi-automatica dell'attività motoria nel sonno REM	17
1.6 Ruolo del neuroimaging	23
2. Scopo del lavoro	27
3. Materiali e metodi.....	28
3.1Pazienti	28
3.2Polisonnografia	30
3.3 ¹²³ I-Ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography (¹²³ I-FP-CIT-SPECT)	33
4. Analisi Statistica.....	35
5. Risultati.....	36
6. Discussione	41
7. Conclusioni	45
8. Bibliografia	46

1. Introduzione

1.1 Disturbo comportamentale del sonno REM (RBD)

Il disturbo comportamentale del sonno REM (RBD, rapid eye movement sleep behavior disorder) è una parasonnia, ovvero un evento disfunzionale che si verifica durante il sonno, identificata per la prima volta nel 1986 (1).

L'RBD si manifesta con comportamenti motori anomali, che si configurano come tentativi di mettere in atto i propri sogni, durante il sonno REM, in associazione al riscontro in polisonnografia (PSG) della perdita della fisiologica atonia muscolare in questa fase del sonno, conosciuta come "REM sleep without atonia" (RSWA) (2).

Il sonno REM è normalmente caratterizzato da una assente attività muscolare scheletrica, detta atonia muscolare, che si evidenzia mediante la polisonnografia con attività muscolare di ampiezza ridotta se non abolita. Al contrario, l'attività muscolare oculare e le caratteristiche elettroencefalografiche sono molto simili alla veglia attiva (3).

Nell'RBD, la perdita di questa la normale atonia durante la fase REM comporta manifestazioni motorie per lo più sotto forma di semplici movimenti elementari, anche nei pazienti con RBD severo (4). In generale si tratta di movimenti rapidi, brevi, del tutto afinalistici, senza alcuna correlazione con azioni e comportamenti definiti (1). Comportamenti violenti sono osservati più raramente, comunque sogni e comportamenti associati possono includere l'essere attaccato o inseguito da persone o animali sconosciuti, portando ad afferrare, prendere a pugni, mordere, calciare o saltare giù dal letto (5). L'RBD

mostra un'alta variabilità nella presentazione tra diverse notti e pazienti in termine di frequenza, durata e tipi di comportamenti (6).

L'RBD può essere classificato in due forme distinte:

- RBD idiopatico (iRBD) (7), ovvero la presenza di un disturbo del sonno isolato, senza la presenza di segni clinici di malattie neurologiche
- RBD secondario, quando è associato a cause sottostanti certe, come malattie autoimmuni (tra cui narcolessia, sindromi paraneoplastiche, encefaliti limbiche, sclerosi multipla), infiammatorie, lesioni focali del tronco encefalico o l'uso di farmaci antidepressivi. (5) (8) (9)

È di grande rilevanza inoltre la forte associazione tra RBD e malattie neurodegenerative, in particolare α -sinucleinopatie, che possono insorgere anche molti anni dopo la diagnosi di iRBD (10)

1.2 Neurofisiologia del sonno REM e fisiopatologia dell'RBD

L'atonia muscolare durante il sonno REM è il risultato di una interazione tra molteplici sistemi neuronali cerebrali: studi animali hanno dimostrato il coinvolgimento di strutture del tronco encefalico, tra cui il locus subcoeruleus/nucleo sublaterale dorsale glutammatergico, il locus coeruleus noradrenergico, i nuclei peduncolopontini e laterodorsale tegmentale colinergici, così come la formazione reticolare gigantocellulare, con ulteriori modulazioni da parte dell'ipotalamo, talamo, sostanza nera, proencefalo basale, sistema limbico e corteccia frontale (11) (12).

In figura 1 sono schematizzati i principali nuclei coinvolti nella genesi e nel controllo del sonno REM.

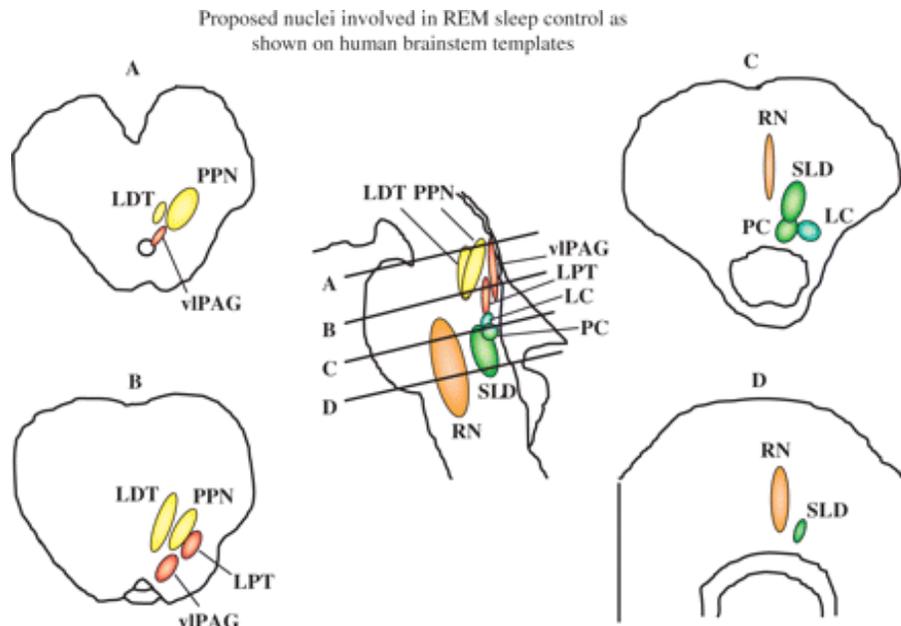


Figura 1: nuclei coinvolti nel controllo del sonno REM, mostrati su un modello di tronco encefalico umano. Le lettere rappresentano delle sezioni trasversali del tronco, con **A** corrispondente alla giunzione pontomesencefalica, **B** al ponte superiore/intermedio, **C** al ponte intermedio/inferiore, mentre **D** è collocata rostralmente alla giunzione pontomidollare.

La regione di REM-off è rappresentata da vIPAG e LPT in rosso, mentre la regione di REM-on è rappresentata da PC e SLD in verde.

eVLPO= parte estesa del nucleo preottico ventrolaterale, LC=locus coeruleus, LDTN=nucleo tegmentale laterodorsale, LPT= tegmento laterale pontino, PC=pre-coeruleus, PPN= nucleo peduncolopontino, RN= nucleo del rafe, SLD=nucleo sublaterodorsale, vIPAG= parte ventrolaterale della sostanza grigia periacqueduttale (13).

Queste strutture sono state concettualizzate in due distinti sistemi motori che permettono il fisiologico sonno REM; uno responsabile della generazione dell'atonia muscolare e l'altro della soppressione

dell'attività di locomozione (13). Durante il sonno, i neuroni serotoninergici discendenti verso i nuclei dei nervi cranici e ai motoneuroni diretti al midollo spinale riducono la loro scarica. Di conseguenza, il tono muscolare è progressivamente ridotto dalle fasi di sonno leggero al sonno profondo, portando alla ipotonia (con tono muscolare ridotto ma ancora presente) e successivamente, durante il sonno REM, i neuroni serotoninergici cessano del tutto la loro scarica. Oltre a questo meccanismo passivo, un meccanismo attivo di paralisi del tono muscolare posturale interviene specificatamente nel sonno REM, garantendo quindi l'atonia muscolare (10).

È stato ipotizzato che la compromissione di una o più aree coinvolte, con successiva disfunzione dei sopracitati meccanismi, sia alla base della perdita di atonia muscolare durante il sonno REM e della patogenesi dell'RBD (13).

Sono inoltre stati eseguiti studi autoptici su pazienti che presentavano RBD, che hanno mostrato la presenza di corpi di Lewy nelle strutture del tronco encefalico deputate alla genesi della atonia del sonno REM (14) (15). È quindi rilevante il fatto che la degenerazione colpisca precocemente le aree del tronco encefalico, provocando l'RBD, prima di concentrarsi sul mesencefalo e sulle strutture limbiche e corticali, causando i segni di alterazione cognitiva e motoria tipici delle α -sinucleinopatie (16).

Sulla base delle ipotesi di Braak sulla progressione patologica dei corpi di Lewy nella malattia di Parkinson, il processo neurodegenerativo potrebbe iniziare nel sistema nervoso enterico ed essere trasmesso tramite una propagazione trans-sinaptica della proteina α -sinucleina mal ripiegata al midollo e al ponte, inducendo RSWA e RBD (17). La sequenza temporale dell'evoluzione dei corpi di Lewy e della degenerazione nella sostanza nera e nella corteccia possono spiegare

rispettivamente i sintomi motori della malattia di Parkinson (PD) e i sintomi cognitivi della demenza a corpi di Lewy (DLB). Tuttavia resta da spiegare perché, se questo modello è accurato, circa la metà dei pazienti PD non presenta affatto RBD, e perché l'RBD in pazienti con DLB o PD può anche presentarsi dopo l'emergenza dei sintomi motori o cognitivi (13).

In definitiva, queste evidenze suggeriscono un processo patologico complesso e altamente eterogeneo tra i pazienti affetti.

Un altro aspetto peculiare risiede nel fatto che pazienti con grave parkinsonismo nel corso di RBD mettono in atto movimenti fluidi e non mostrano tremore o bradicinesia, in contrasto con la clinica durante la veglia (18). È quindi probabile che durante il sonno REM i normali circuiti motori comprendenti i gangli della base, molto colpiti in questi pazienti, non vengano utilizzati a favore di altri ancora funzionanti, dando quindi speranza di trovare nuovi modi per attivare questi pathways motori anche durante la veglia (10). Tale ipotesi è stata successivamente confermata in vivo con uno studio di imaging funzionale durante episodi di RBD (19).

1.3 Epidemiologia e fattori di rischio

L'RBD è la parasonnia più frequente e sebbene in molti precedenti studi osservazionali sia emersa una prevalenza maschile (rapporto M/F variabile fino a 8:1 in coorti accertate da cliniche del sonno (20)) un più recente studio mostra per l'RBD idiopatico una prevalenza del disturbo di 1,06% nei soggetti sopra i 60 anni, senza differenza significativa tra i due sessi, suggerendo che la forte predominanza maschile possa essere ricondotta a un bias di selezione, con una maggiore

manifestazione aggressiva e violenta del disturbo, e quindi di implicazioni cliniche, in questo sesso (21).

L'RBD inizia tipicamente nella quinta o sesta decade di vita. Tuttavia, alcuni pazienti con un RBD secondario hanno riportato una età minore all'esordio, in particolare individui con narcolessia di tipo 1 e malattie autoimmuni cerebrali (8).

Anche l'uso di alcuni farmaci può determinare l'insorgenza di RBD o RSWA, in particolare gli SSRI, la clomipramina, la selegilina e la fenelzina (22).

La prevalenza dell'RBD secondario varia a seconda del disordine primario. Complessivamente, tra il 30% e il 50% di pazienti con PD hanno RBD (23), comparati con più del 70% nella DLB o MSA (24). Inoltre, più del 50% di pazienti con narcolessia mostrano RBD o RSWA (25).

Alcuni dei fattori di rischio per l'iRBD sono simili ai fattori di rischio per le α -sinucleinopatie, per esempio l'esposizione a pesticidi e traumi cranici sono più comuni in pazienti con iRBD rispetto a individui senza iRBD (26). Al contrario, altri fattori di rischio differiscono: nei pazienti con iRBD l'abitudine al fumo è più comune (mentre la relazione è opposta nella malattia di Parkinson) (27), così come la prevalenza di malattia ischemica, malattia polmonare ostruttiva cronica e depressione (quest'ultima forse legata all'uso di farmaci antidepressivi) (28).

Infine, è stata individuata una componente genetica legata alla insorgenza di iRBD: sono fattori di rischio genetici per iRBD polimorfismi in LRRK2, SNCA e in GBA (codificante per l'enzima glucocerebrosidasi); quest'ultimo ha alta incidenza nell'RBD idiopatico

ed è inoltre correlato al fenotipo più grave della malattia di Parkinson (29).

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che il fenotipo RBD idiopatico, inteso come la sequenza con esordio di iRBD e successiva conversione a malattia di Parkinson o demenza a corpi di Lewy, possa avere una suscettibilità genetica, anche se una aggregazione familiare definita nell'RBD è ancora oggetto di dibattito (30).

1.4 Rischio di sinucleinopatia

Molti studi osservazionali hanno suggerito che la maggior parte di pazienti con iRBD svilupperanno nel corso della loro vita una definita patologia neurodegenerativa (31) (32). Recentemente, uno studio multicentrico ha mostrato un indice di conversione fenotipica di 6,25% all'anno, con il 73,5% dei pazienti che mostravano una conversione da iRBD a una chiara sindrome neurodegenerativa entro 12 anni di follow-up, e una mediana di 8 anni (33).

In particolare, l'associazione tra RBD e α -sinucleinopatie è stata estesamente documentata; il più grande studio di casi di RBD probabili o confermati da polisonnografia e sottoposti ad autopsia finora eseguito ha mostrato che tra tutti i disordini neurodegenerativi associati a RBD, il 94% del totale erano α -sinucleinopatie (34).

Insieme all'RBD, sono stati descritti altri marker diagnostici per lo stadio prodromico di malattia: stipsi, iposmia, depressione, disordini autonomici cardiaci spesso appaiono nella fase prodromica della malattia di Parkinson (35).

Uno studio prospettico ha individuato un rischio più alto di conversione a PD o a demenza nei pazienti che al momento della

diagnosi di RBD presentavano una riduzione dell'olfatto o della visione dei colori (36).

Un recente studio multicentrico internazionale ha mostrato che i predittori più importanti di fenocconversione a sinucleinopatia a breve termine (a tre anni circa dalla diagnosi) fossero la deafferentazione dopaminergica nigro-putaminale, la presenza di stipsi e l'età avanzata (oltre 70 anni) (37).

Il lungo intervallo prodromico tra l'apparizione di sintomi/segni neurodegenerativi e lo sviluppo della malattia conclamata, e il citato ruolo dell'RBD come biomarcatore precoce, spiegano perché i pazienti affetti da iRBD siano candidati ideali per l'osservazione dei prodromi di questi processi neurodegenerativi e per essere arruolati in futuri trial terapeutici modificanti il decorso della patologia, con l'obiettivo di trovare nuovi metodi per ritardare il più possibile la presentazione della malattia conclamata (33).

Questo assume ancora più rilevanza alla luce della prevalenza dell'RBD nella popolazione anziana: allo stato attuale, all'incirca l'1% di persone sopra i 60 anni hanno una malattia neurodegenerativa facilmente diagnosticabile (ma spesso non individuata) ad uno stadio precoce (21).

1.5 Diagnosi di RBD

La diagnosi di RBD si basa sulla Classificazione Internazionale dei Disturbi del Sonno, Terza Edizione (ICSD-3), che include una storia di vocalizzazioni nel sonno e/o comportamenti motori complessi, tipicamente corrispondenti a messe in atto dei propri sogni, che accadono durante il sonno REM o sono presunti accadere in questa

fase del sonno, insieme a una registrazione polisonnografica che mostri l'assenza di atonia in sonno REM (Tabella 1) (2).

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)

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

1.5.1 Manifestazione clinica

I comportamenti motori osservati nei pazienti con RBD possono includere scatti eccessivi del corpo o degli arti, fino a movimenti complessi e apparentemente finalizzati. Solitamente, il comportamento si manifesta come un tentativo di mettere in scena sogni spiacevoli, pieni d'azione e violenti, in cui l'individuo viene attaccato o inseguito da persone sconosciute o animali (10). Poiché il sonno REM è più rappresentato nella seconda parte della notte, e in particolare nel terzo finale del periodo di sonno, tali episodi sono registrati prevalentemente in questo momento della notte (38). Parallelamente all'attività motoria, anche se con minor frequenza, è

presente una ricca attività di vocalizzazione (39), con borbottii e talvolta un parlato chiaro, fino a sonore risate, urla, pianti e imprecazioni (24).

L'RBD si discosta clinicamente da altre parasonnie come il sonnambulismo in quanto i soggetti con RBD generalmente rimangono con gli occhi chiusi e raramente si alzano dal letto e camminano (10). Allo stesso modo, i pazienti non includono spesso l'ambiente circostante nei loro gesti, il che vuol dire che, ad esempio, non utilizzano utensili o altri oggetti oppure mangiano come farebbero soggetti affetti da parasonnie NREM o persone con comportamenti alimentari legati al sonno (40). Quest'ultimo aspetto limita il rischio di danni fisici gravi, sebbene il pericolo di lesioni fisiche per il paziente stesso e per l'eventuale compagno di letto sia elevato (41): le lesioni riportate spesso possono necessitare cure mediche e rappresentano una delle principali motivazioni per cui il paziente giunge all'attenzione clinica (42).

Clinicamente, è spesso difficile individuare questi comportamenti in quanto il paziente potrebbe non averne consapevolezza, non ricordarsi il contenuto dei sogni o mostrare un deterioramento cognitivo: sono dunque estremamente importanti per la diagnosi (quando è possibile reperirle) anche le informazioni fornite dal compagno/a di letto (10).

Oltre al dato anamnestico, anche l'esame neurologico è un fondamentale apporto e la ricerca di eventuali segni prodromici di sinucleinopatia (ipotensione ortostatica, iposmia, stipsi, alterata visione dei colori) o eventualmente di segni di sinucleinopatia già in atto può essere di grande importanza come ulteriore apporto al sospetto clinico (43).

1.5.2 Registrazione elettromiografica alla polisonnografia

Il riscontro di sonno REM senza atonia (RSWA) alla polisonnografia è il substrato neurofisiologico dell'RBD e un requisito per la diagnosi definitiva, la quale necessita dunque di un esame polisonnografico che documenti la presenza o l'eccesso di tono muscolare e/o un eccesso di contrazioni fasiche del muscolo mentale e/o degli arti durante il sonno REM, insieme ad eventuali comportamenti anomali visibili alla registrazione video (10). La sola valutazione clinica suggestiva di RBD in assenza di registrazione video-polisonnografica porta alla definizione di "RBD probabile" ma non a diagnosi certa (10).

L'RSWA può essere riscontrato anche come reperto isolato o accidentale durante la polisonnografia; un RSWA con aumento dell'attività muscolare fasica (ma non di tipo tonica) è presente nel 25% della popolazione generale, senza sintomi o segni di rappresentazione motoria dei sogni (44). L'RSWA isolato ha mostrato un significato prognostico, con un 7% di coloro che avevano dimostrato un RSWA isolato che convertiranno successivamente a RBD conclamato, con evidenti segni clinici (45).

È stato dimostrato che il RSWA ha una elevata stabilità da notte a notte, perciò una singola notte di video-polisonnografia è generalmente sufficiente per la diagnosi di RBD, purchè una sufficiente quantità di sonno REM sia presente durante la registrazione (46).

Sono stati definiti e proposti diversi cut-off diagnostici per l'RBD, tuttavia, ad oggi, non esiste uno standard universalmente accettato, anche se le tecniche meglio validate e maggiormente adottate sono quelle del gruppo SINBAR (Sleep Innsbruck Barcelona) e Montreal (47) (48).

Per l'analisi dell'attività elettromiografica (EMG) durante il sonno REM, si procede quindi a classificare l'attività motoria anomala in "tonica", "fasica", o "qualsiasi attività" (49) (48):

- Attività tonica: attività EMG, aumentata di almeno il doppio della ampiezza di baseline, in più di metà della durata dell'epoca considerata. Possono essere usate mini-epoche da 3 secondi o epoche da 30 secondi.
- Attività fasica: attività EMG transiente che duri da 0,1 a 5 secondi, con un'ampiezza che superi almeno la metà della attività di baseline, in più di metà della durata dell'epoca considerata. Può essere misurata in mini-epoche da 3 secondi o in epoche da 30 secondi.
- Qualsiasi attività ("any"): qualunque attività muscolare, tonica e/o fasica, in più di metà della durata dell'epoca considerata.

Il metodo di scoring visivo della American Academy of Sleep Medicine (AASM) deriva dal metodo Montreal, ma utilizza un diverso approccio nella valutazione di epoche da 30 secondi come positive o negative per la presenza o meno di almeno 5 mini-epoche da 3 secondi contenenti attività muscolare fasica anomala. (50)

Inizialmente, l'attività muscolare anomala era quantificata unicamente tramite il muscolo mentale, ma quest'ultimo, valutato da solo, potrebbe portare a un numero elevato di artefatti respiratori e dovuti al russamento. Inoltre, mostra una bassa correlazione con la maggior parte dei comportamenti manifestati durante il sonno REM e la differenziazione tra attività fasica e tonica può essere difficoltosa anche ai valutatori più esperti (51).

Il gruppo SINBAR (Sleep Innsbruck Barcelona) ha valutato l'attività muscolare alla EMG in differenti muscoli negli arti superiori e inferiori di soggetti con RBD e in controlli e ha dimostrato un eccesso di attività fasica anche in diversi muscoli degli arti, in particolare nei muscoli flessori superficiali delle dita. Secondo questi autori, tali muscoli sarebbero meno propensi a mostrare artefatti, gli elettrodi sono facilmente collocabili e il tracciato EMG risulta più facilmente valutabile (47).

Al contrario, la quantificazione elettromiografica dei muscoli degli arti inferiori non ha mostrato un vantaggio addizionale nel differenziare pazienti con RBD dai controlli, se comparati con la combinazione del mentale con gli arti superiori (47). La ragione di ciò potrebbe risiedere nell'overlap con altri fenomeni fasici come il mioclono frammentario o il disturbo da movimento periodico degli arti nel sonno (PLMD) (52).

È stato pertanto suggerito l'utilizzo di un montaggio PSG che quantifichi sia l'attività tonica sia la fasica nel muscolo mentale e l'attività fasica nei muscoli flessori digitali superficiali destro e sinistro degli arti superiori, in maniera tale da distinguere accuratamente i pazienti RBD dai controlli (47).

Ad ogni modo, gli stessi autori affermano che per la routine clinica il parametro "qualsiasi attività" della misurazione EMG nel muscolo mentale sia sufficiente per la diagnosi di RBD: eliminando la difficoltosa distinzione tra attività fasica e tonica, consegue una notevole diminuzione della complessità del processo di scoring e del tempo necessario alla valutazione, e dunque si propone come il principale parametro da utilizzare dai software di scoring automatico che in futuro potrebbero entrare nella pratica clinica (47).

I valori di cut-off suggeriti per stabilire un incremento di attività EMG durante il sonno REM sono i seguenti (47):

- 18,2% di “qualsiasi” attività EMG del solo muscolo mentale, utilizzando mini-epoche da 3 secondi
- 32% per la combinazione di “qualsiasi” attività EMG del mentale e l’attività fasica nei muscoli flessori superficiali delle dita destro e sinistro, usando mini-epoche da 3 secondi

Tuttavia, sono necessari studi multicentrici per validare ulteriormente questi parametri per la diagnosi di RBD. La valutazione in maniera separata dell’attività tonica e fasica potrebbe fornire ulteriori importanti informazioni, poiché è possibile che si basino su differenti processi patofisiologici e mostrino diversa risposta al trattamento farmacologico (53).

Un esempio di PSG in paziente con RBD, comparato un controllo sano, può essere osservato in figura 2.

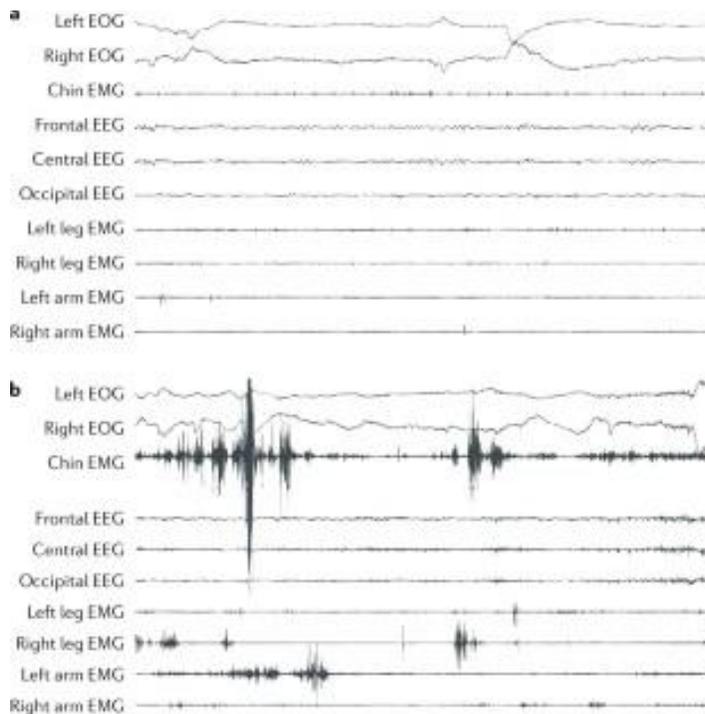


Figura 2: registrazione PSG di sonno REM.

a | Polisonnografia (PSG) di un individuo sano di controllo.

b | Registrazione PSG di un paziente con disturbo comportamentale del sonno REM. Notare la attività elettromiografica nel canale EMG del muscolo mentale e dell'arto superiore sinistro. Il tracciato EMG dell'arto inferiore è stato ottenuto dai muscoli tibiale anteriore sinistro e destro, e quello dell'arto superiore dal flessore superficiale delle dita sinistro e destro.

EEG, elettroencefalogramma; EOG, elettroculogramma (54)

1.5.3 Analisi semi-automatica dell'attività motoria nel sonno REM

Ad oggi, la valutazione manuale rimane il gold standard per l'analisi della attività EMG nel sonno REM (49). Tuttavia, utilizzare tali metodi visivi per la valutazione della attività motoria in sonno REM richiede molto tempo. Inoltre, ci può essere una significativa variabilità tra gli operatori con diversa esperienza o che lavorano in centri diversi, pertanto, sono stati sviluppati diversi metodi di analisi automatica o semi-automatica (55) (56) (57) (58).

Questi metodi di scoring computerizzati sono stati testati confrontandoli con la analisi visiva e hanno dimostrato una efficacia paragonabile nella differenziazione tra iRBD o RBD associato a malattie neurodegenerative da controlli sani (57) (56) (55) (58).

Il metodo di Mayer *et al.* prevede la distinzione di attività EMG di breve (meno di 0.5 s) o lunga (più di 0.5 s) durata, e una analisi elettromiografica condotta su finestre di un secondo. È stato considerato come valore di baseline l'ampiezza media del segnale

motorio su 200 secondi e come soglia per la definizione di attività motoria un incremento di almeno la metà di tale baseline. Utilizzando questo metodo automatizzato, l'adozione di un cutoff di 2% di sonno REM mostrante un incremento dell'attività motoria si è rivelata ottimale per la distinzione tra RBD e controlli (55). Questo metodo semi-automatizzato ha mostrato, nella valutazione del muscolo mentale, una sensibilità del 72,5%, una specificità dell'86,7% e un valore di area sotto la curva (AUC) di 0.819, quando sono stati utilizzati insieme i valori dell'attività muscolare di breve e di lunga durata (equivalente al parametro "any REM" dello scoring manuale). È stata inoltre l'unica metodica di cui è stata indagata la capacità di differenziare l'RBD da parasonnie del sonno non REM (NREM) mostrando complessivamente una sensibilità del 72.5% e una specificità dell'86,7% nel distinguere pazienti con RBD da pazienti affetti da sonnambulismo, terrori notturni, sindrome delle gambe senza riposo e apnea ostruttiva del sonno (59).

Nello studio di Ferri *et al.* è stata comparata l'analisi visiva con un metodo automatico per il riconoscimento dell'incremento dell'attività muscolare nel sonno REM. È stata valutata l'attività motoria sia tonica che fasica. Il metodo visivo definiva un aumento di attività tonica come la rilevazione di un'ampiezza di almeno 10 microV o del doppio rispetto al valore di baseline. Se più del 50% di ciascuna epoca di 30 s mostrava un incremento di attività motoria, l'intera epoca era definita come attività motoria aumentata. Questo metodo automatizzato utilizzava mini-epoche da 1 secondo. È stato quindi calcolato un "REM atonia index" che può assumere valori compresi tra 0 (completa assenza di atonia muscolare) e 1 (completa presenza di atonia muscolare). Un cutoff <0.8 di REM atonia index ha ottenuto un valore

di AUC di 0.83, con una sensibilità dell'84% e una specificità dell'81% (56).

Il metodo automatizzato di Kempfner *et al.* ha utilizzato un supporto macchina vettoriale (SVM), le registrazioni EMG sia del muscolo mentale sia di entrambi i muscoli tibiali, e le registrazioni elettro-oculografiche (EOG) di entrambi gli occhi. L'analisi ROC ha rivelato una AUC di 0.993, che è stata poi supportata dall'abilità dell'algoritmo di identificare 12 nuovi pazienti come malati. La complessa analisi SVM ha dimostrato di avere la più alta abilità di identificazione della malattia e di separazione dai controlli sani finora riportata in letteratura (58).

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

- 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 s 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 s.
 - 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 s.
 - 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 di 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 (57).

In figura 3 è possibile osservare un esempio di segmento di tracciato EMG al quale vengono applicati alcuni dei parametri descritti sopra.

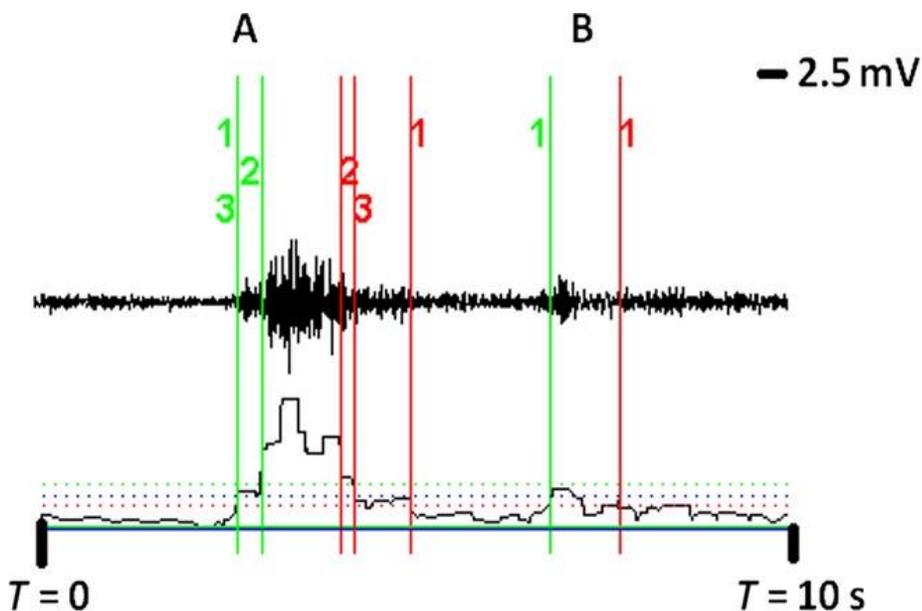


Figura 3: segmento di attività motoria di 10 s al quale vengono applicati tre metodi di valutazione del baseline e combinazioni di parametri che definiscono la durata minima e il periodo minimo tra eventi di attività muscolare (MAE). Le linee verdi verticali in ogni evento motorio indicano l'inizio dell'evento quando calcolato con ciascuno dei tre modelli di baseline (1= baseline globale, 2= dipendente dalla fase del sonno, 3= finestra mobile). Le linee rosse rappresentano la fine dell'evento.

L'evento A viene rilevato da tutti e tre i modelli di riferimento, ma è più breve nel metodo dipendente dalla fase del sonno (2) e nella finestra mobile (3). L'evento B viene rilevato solo dal modello di base globale (1). 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 (MADT) per ciascuno dei tre modelli di baseline scelto (57).

Gli autori hanno riscontrato che la miglior combinazione nella differenziazione tra RBD e controlli, 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

In una analisi comparativa, questo modello si è mostrato correlare con quello elaborato da Kempfner, nonostante sia stata utilizzato solamente il canale di attività motoria del muscolo mentale (57).

Nonostante gli interessanti dati ottenuti con i diversi metodi di quantificazione semi-automatica della RSWA, l'esperienza acquisita finora con questi nuovi software è ancora limitata in quanto tutti gli algoritmi sopra citati sono stati utilizzati unicamente per scopo di ricerca ed in numeri limitati di soggetti. Un altro importante problema da tenere in considerazione è che nell'utilizzo tutti questi software, l'individuazione di artefatti (per esempio russamento, risvegli legati a eventi respiratori, etc.) nel tracciato elettromiografico è dovuta avvenire manualmente attraverso un apposito controllo dei data set, dal momento che non è ancora stato integrato nei programmi una metodica di ricerca automatica di tali artefatti (49).

L'utilizzo esteso nella pratica clinica di una metodica di analisi semi-automatica per lo scoring dell'attività EMG nel sonno REM potrebbe portare a importanti vantaggi come un notevole risparmio di tempo,

indipendenza dal valutatore e facilità di applicazione, permettendo pertanto l'analisi di dataset molto più estesi (54).

1.6 Ruolo del neuroimaging

Dopo la diagnosi di iRBD, il maggior fattore di rischio per lo sviluppo di malattia di Parkinson consiste nella presenza di alterazione del sistema dopaminergico presinaptico, studiato mediante esami di neuroimaging come la tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT) o la tomografia ad emissione di positroni (PET) (60).

Nella figura 4 è rappresentato il rischio di sviluppo di malattia di Parkinson in pazienti con RBD idiopatico.

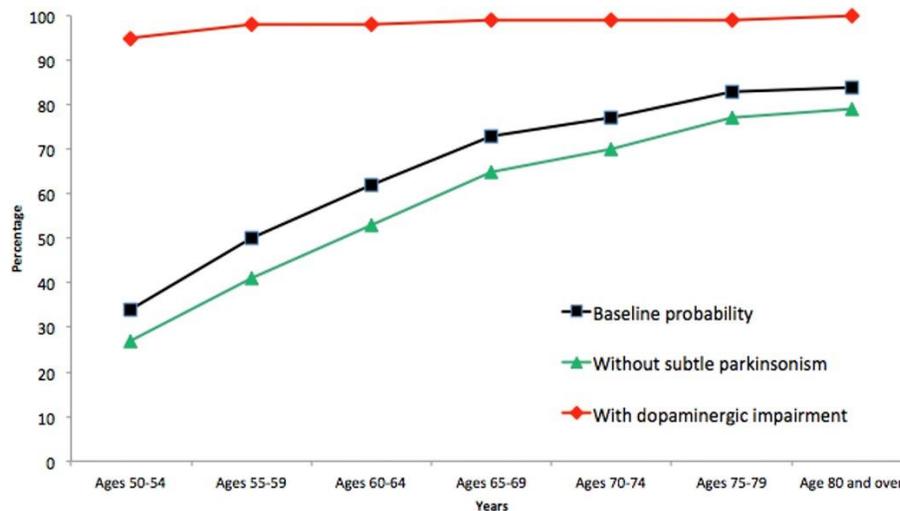


Figura 4: Rischio di Parkinson prodromico in pazienti con iRBD, in un intervallo di 5 anni. Il rischio è calcolato sulla base di quello stimato da Berg et al. (in nero); viene mostrato la modificazione del rischio quando sono assenti segni subclinici di parkinsonismo (curva verde) e quando è presente un'alterazione funzionale dopaminergica alla SPECT con trasportatore della dopamina (DAT) (curva rossa).

Rischio in assenza di segni di Parkinsonismo sublinico: 27% (95% CI 25-28) dai 50 ai 54 anni; 41% (95% CI 40-43) dai 55 ai 59; 53% (95% CI 52-55) dai 60 ai 64; 65% (95% CI 64-67) dai 65 ai 69; 70% (95% CI 69-71) dai 70 ai 74; 77% (95% CI 76-78) dai 75 ai 79; e 79% (95% CI 78-80) dagli 80 anni in su.

Rischio valutato in presenza di disfunzione dopaminergica: 95% (95% CI 90-98) dai 50 ai 54 anni; 98% (95% CI 94-99) dai 55 ai 59; 98% (95% CI 96-99) dai 60 ai 64; 99% (95% CI 97-100) dai 65 ai 69; 99% (95% CI 97-100) dai 70 ai 74; 99% (95% CI 98-100) dai 75 ai 79; 100% (95% CI 98-100) dagli 80 in su.

CI: intervallo di confidenza. (30)

La dopamina svolge infatti un ruolo centrale nella regolazione del movimento e l'integrità del sistema dopaminergico è stata ripetutamente indagata nell'RBD. I primi studi con [11C] dihydrotetrabenazine PET (61) e 123I-N-3-fluoropropyl-2beta-carbomethoxy-3beta-4-iodophenyl tropane (¹²³I-FP-CIT) SPECT (62) come marcatori, rispettivamente, dei trasportatori vescicolari intracellulari della dopamina o del trasportatore della dopamina (DAT), hanno mostrato un funzionamento dopaminergico diminuito nei pazienti iRBD se comparati con soggetti sani. 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, del numero dei neuroni dopaminergici nigro-striatali (63).

Lo studio SPECT dopaminergico presinaptico ha mostrato di essere in grado di identificare la malattia di Parkinson e i disordini correlati in stadi molto precoci di malattia (64). Può inoltre essere di aiuto nella

diagnosi differenziale tra condizioni patologiche con e senza deficit dopaminergico presinaptico, consentendo una diagnosi precoce ed accurata (65).

In particolare, il DAT presinaptico è precocemente alterato nel putamen posteriore nel corso di malattia di Parkinson e dimostra una caratteristica asimmetria nel pattern di perdita di segnale. (66). I tipici reperti DAT SPECT riscontrati in pazienti con malattia di Parkinson sono mostrati in figura 5.

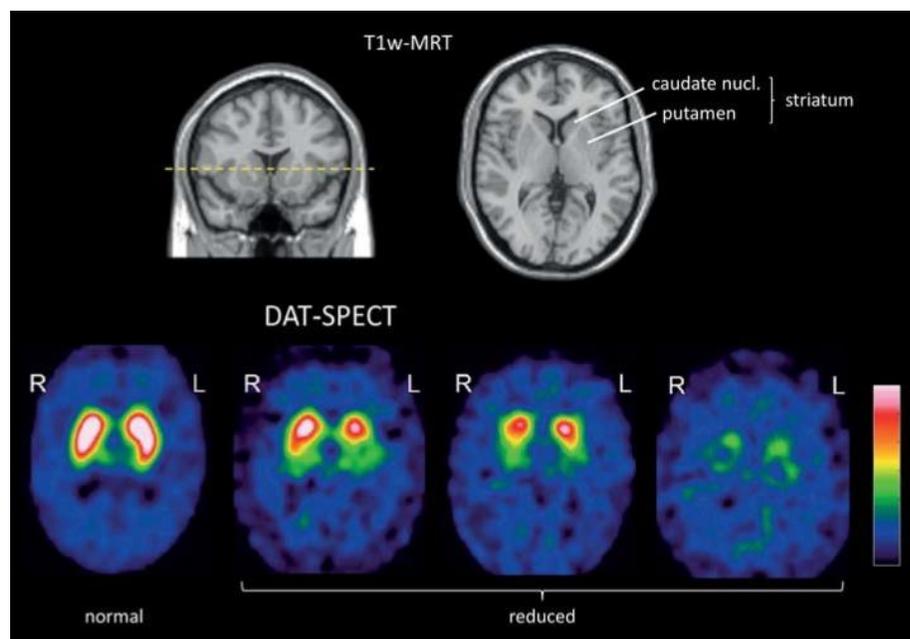


Figura 5: I reperti DAT-SPECT tipici in pazienti con sindrome parkinsoniana idiopatica mostrano una disponibilità di DAT striatale ridotta rispetto a controlli sani. Il putamen posteriore è quasi sempre il maggiormente affetto (67). I sintomi motori si manifestano solo dopo una perdita di DAT nel putamen di almeno il 50%. (68).

DAT-SPECT= single photon emission computed tomography with dopamine transporter ligands (69).

Il livello di legame del marcatore al DAT striatale nel PD correla con le valutazioni cliniche di bradicinesia e rigidità controlaterali (70), così come con il grado di perdita neuronale dopaminergica nella sostanza nera post-mortem (71).

Nei pazienti PD inoltre, la DAT-SPECT correla non solo con i sintomi motori della malattia, ma anche con il declino della funzione cognitiva (72), e potrebbe addirittura predire il declino cognitivo (73) specialmente quando combinato con altri parametri come l'età e il livello di α -sinucleina nel liquor cerebrospinale (74).

Gli studi condotti con questa metodica di imaging su pazienti con iRBD, dimostrano consistenti evidenze di riduzione dei livelli di dopamina presinaptica striatale: comparando i soggetti con iRBD a controlli sani si è dimostrato che circa il 20-40% dei pazienti RBD mostrano un imaging DAT anomalo (75). Nei pazienti con iRBD è stata osservata una diminuzione dei trasportatori striatali della dopamina, con un continuum di riduzione da RBD subclinico a clinico fino alla diagnosi di PD (76), suggerendo che l'imaging dopaminergico possa avere il potenziale di quantificare la progressione attraverso la fase prodromica della malattia.

È rilevante il fatto che la deafferentazione dopaminergica sia risultata più pronunciata nel putamen (62) (77) (78), dato il fatto che la perdita di integrità dopaminergica nel PD tipicamente inizia nel putamen dorsale. (79). Invece la deafferentazione nigro-caudata sembra essere una caratteristica specifica dell'RBD, sia nella forma idiopatica che associato a PD. (80).

Diversi studi hanno dimostrato che le anomalie al DAT-SPECT identificano pazienti iRBD a maggior rischio di conversione fenotipica (76) (32). Uno studio del 2017 ha evidenziato per la DAT-SPECT una

sensibilità del 75%, una specificità del 51%, un valore predittivo positivo del 44% ed un valore predittivo negativo dell'80% nel predire lo sviluppo di una sinucleinopatia (PD, DLB, MSA) (76). Infine, in un recente studio multicentrico internazionale la DAT-SPECT è risultata essere il singolo fattore di rischio più importante nel predire la fenocconversione a sinucleinopatia nei pazienti iRBD (37).

2. Scopo del lavoro

Il riscontro di sonno REM senza atonia (RSWA) alla polisonnografia è il substrato neurofisiologico del disturbo comportamentale del sonno REM e un requisito per la diagnosi definitiva, la quale deve necessariamente avvalersi di un esame polisonnografico che documenti la presenza o l'eccesso di tono muscolare e/o un eccesso di contrazioni fasiche del muscolo submentoniero e/o degli arti durante il sonno REM (10). Ad oggi, la valutazione manuale rimane il gold standard per l'analisi della attività EMG nel sonno REM (49), ma l'introduzione nella pratica clinica di modelli di analisi dell'attività muscolare semi-automatizzati potrebbe comportare benefici come un notevole risparmio di tempo, indipendenza dal valutatore e facilità di applicazione, permettendo pertanto l'analisi di dataset molto più estesi (54). Allo stato attuale tuttavia, l'esperienza acquisita con questi nuovi software è ancora limitata in quanto tutte queste metodiche semi-automatizzate sono stati utilizzate unicamente per scopo di ricerca ed in numeri limitati di soggetti. Inoltre, ad oggi non sono ancora state estesamente indagate correlazioni tra i risultati ottenuti da tali metodiche di quantificazione semi-automatica della RSWA e modificazioni dell'attività dopaminergica nigrostriatale.

Scopo del presente lavoro è validare la capacità diagnostica del metodo semi quantitativo di analisi dell'attività muscolare utilizzato da Frandsen *et al.* in un campione indipendente 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 nigrostriatale studiata attraverso esame SPECT dopaminergico presinaptico (DAT SPECT).

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

Sono stati studiati 126 pazienti, di cui 45 con RBD idiopatico (iRBD), 24 con malattia di Parkinson (PD) senza RBD, 46 con PD e RBD e 11 controlli sani.

I criteri di inclusione sono stati la diagnosi di iRBD confermata da videopolisonnografia (2) e la diagnosi di PD (81), in accordo agli attuali criteri diagnostici internazionali. 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, 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
- “Mayo Sleep Questionnaire” (82) somministrato al compagno/a di letto.
- Presenza di “eccessiva” attività muscolare alla PSG, secondo gli attuali criteri internazionali (cut-off del 30% per l'attività tonica e del 15% per l'attività fasica a carico dell'EMG muscolo mentale (48)).

Inoltre, tutti i soggetti hanno effettuato una estesa valutazione neuropsicologica al fine di escludere la presenza di demenza: sono stati effettuati il “Mini-Mental State Examination” (MMSE) per valutare le capacità cognitive generali dei soggetti e il “Beck Depressive Inventory” (BDI) per escludere la presenza di depressione. Per la misurazione dell'attenzione e le funzioni esecutive sono stati eseguiti Stroop test, Trail Making Test B e Wisconsin Card Sorting Test; Trail Making Test A e Digit Symbol Test hanno permesso di indagare l'integrazione visuomotoria. Il Digit span (forward – backward) ha fornito informazioni sulla memoria di lavoro; la memoria verbale è stata valutata con il Rey Auditory Verbal Learning Test e il Babcock Story test; Corsi span (forward – backward) e le figure di Rey hanno permesso di indagare le funzioni visuospatiali. Per la valutazione del linguaggio sono state valutate la Fluenza fonemica e la Fluenza semantica. Sono state inoltre investigate le attività della vita quotidiana di base (ADL) e strumentali (IADL).

I pazienti iRBD con conferma diagnostica PSG ed i pazienti PD sono stati sottoposti a ^{123}I -FP-CIT-SPECT, che ha permesso di valutare la funzione dopaminergica nigro-striatale.

3.2 Polisonnografia

La polisonnografia (PSG) è una metodica multiparametrica che permette di monitorare e registrare il sonno. Oltre al suo utilizzo nella conferma diagnostica clinica di RBD ed altre parasonnie, la polisonnografia ha l'indicazione clinica nella diagnosi dei disturbi respiratori legati al sonno, l'identificazione del disturbo da movimenti periodici degli arti in sonno e per la narcolessia. Il monitoraggio del sonno con PSG è stato effettuato nel corso di una singola notte in accordo con i criteri internazionali raccomandati dall'AASM (2).

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 6)

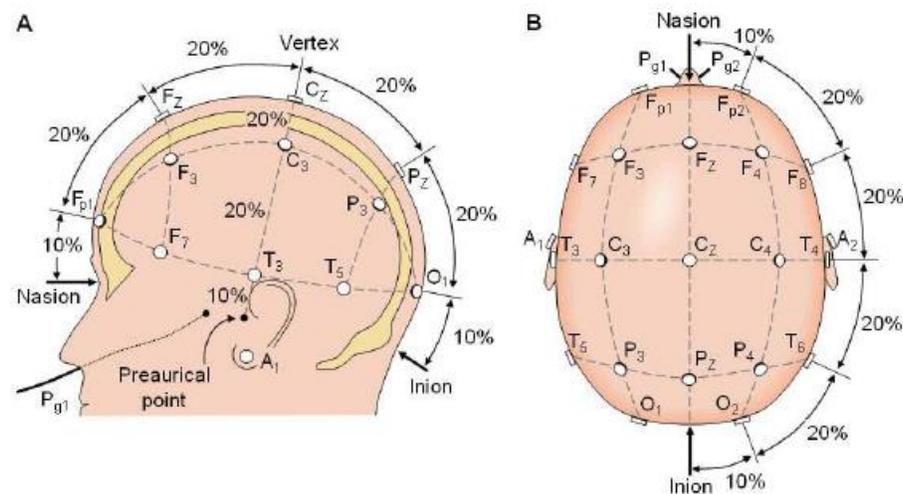


Figura 6: schematizzazione del sistema di applicazione degli elettrodi "10-20" per EEG nella polisonnografia.

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). 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 (2):

- 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.*. Lo scoring manuale è avvenuto in accordo con Frauscher *et al* (44), 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 sonno REM senza atonia (RWA) ottenuta tramite l'impiego dell'algoritmo di Frandsen *et al.* con il nome di “Automatic RWA”. 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 RWA 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 ¹²³I-Ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography (¹²³I-FP-CIT-SPECT)

Tutti i pazienti con iRBD confermato da PSG ed i pazienti PD sono stati sottoposti ad una ¹²³I-FP-CIT-SPECT, al fine di valutare la presenza di un'iniziale degenerazione nigro-striatale. La ¹²³I-FP-CIT-SPECT è stata eseguita per mezzo di una gamma camera Millenium 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 ¹²³I-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 (83). 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 <15cm, 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 millimetri. 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 BasGan, 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 (84). 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 100 soggetti normali forniti dalla banca dati europea ENC-DAT (85).

4. Analisi Statistica

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 RWA e lo scoring visivo dell'attività motoria, è stata effettuata una correlazione di Pearson.

Per verificare la capacità di ciascuno dei parametri di RWA visivi (REM tonico, REM fasico e Any REM) e del metodo semi automatico (Automatic RWA) 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 RWA 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 RWA, sia di tipo visivo che semi-automatico, con alterazioni dell'attività dopaminergica nigrostriatale studiata attraverso esame DAT SPECT.

Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

5. Risultati

I principali dati clinici, demografici e polisomnografici sono riassunti in Tabella 2.

Tabella2: Principali parametri clinici, demografici e polisomnografici nei pazienti affetti da RBD idiopatico (iRBD), PD con RBD (PD+RBD), PD senza RBD (PDnoRBD) e controlli sani (CTR), riportati come media \pm DS

	CTR (n=11)	PDnoRBD (n=24)	iRBD (n=45)	PD+RBD (n=46)	P value	Confronto post- hoc
Sesso, M	5 (45.45%)	13 (54.16%)	36(80.00%)	29(63.04%)	0.028	-
Età (anni)	67.27 \pm 11.41	66.67 \pm 9.47	68.51 \pm 7.79	72.46 \pm 6.25	0.015	PDnoRBD<PD+RBD
REM fasico	3.28 \pm 3.41	5.77 \pm 3.94	45.38 \pm 23.03	29.77 \pm 20.22	<0.0001	CTR<iRBD CTR<PD+RBD iRBD>PDnoRBD iRBD>PD+RBD PDnoRBD<PD+RBD
REM tonico	1.07 \pm 1.74	2.73 \pm 2.59	38.35 \pm 25.40	45.44 \pm 29.97	<0.0001	CTR<iRBD CTR<PD+RBD iRBD>PDnoRBD PDnoRBD<PD+RBD
REM any	4.90 \pm 4.77	7.78 \pm 4.92	59.61 \pm 23.48	57.35 \pm 24.81	<0.0001	CTR<iRBD CTR<PD+RBD iRBD>PDnoRBD PDnoRBD<PD+RBD
Automatic RWA	0.13 \pm 0.20	0.11 \pm 0.07	0.28 \pm 0.18	0.39 \pm 0.21	<0.0001	CTR<PD+RBD iRBD>PDnoRBD PDnoRBD<PD+RBD
AHI	4.87 \pm 6.80	12.84 \pm 18.61	5.72 \pm 7.84	16.41 \pm 18.12	NS	-
PLMI	20.61 \pm 40.86	5.75 \pm 9.94	25.22 \pm 37.84	24.24 \pm 27.55	NS	-
Caudato (AVG)	-	2.55 \pm 1.01	3.52 \pm 1.10	2.24 \pm 0.62	<0.0001	iRBD>PDnoRBD iRBD>PD+RBD
Putamen (AVG)	-	1.53 \pm 0.65	2.85 \pm 0.95	1.36 \pm 0.51	<0.0001	iRBD>PDnoRBD iRBD>PD+RBD
Z Caudato	-	-1.69 \pm 0.33	-1.24 \pm 0.42	- 1.69 \pm 0.30	<0.0001	iRBD>PDnoRBD iRBD>PD+RBD
Z Putamen	-	-1.92 \pm 0.36	-1.29 \pm 0.28	- 1.85 \pm 0.30	<0.0001	iRBD>PDnoRBD iRBD>PD+RBD

Legenda: AHI (indice di apnea/ipopnea), PLMI (periodic leg movement index). Caudato(AVG)=valore medio DAT SPECT caudato, Putamen(AVG)=valore medio DAT SPECT putamen, Z caudato=valore caudato normalizzato, Z putamen=valore putamen normalizzato, NS= non significativo

Osservando i dati di quantificazione della RWA (Tabella 2) si evince che i parametri in esame sono tutti significativamente diversi tra i gruppi. All'analisi post-hoc di Bonferroni, si nota come i gruppi CTR e PDnoRBD non presentino differenze statisticamente significative tra di loro, e possano pertanto essere considerati come unico gruppo (Soggetti senza RBD). Analogamente, i gruppi iRBD e PD+RBD non mostrano differenza statisticamente significative tra di loro e sono quindi raggruppabili in un unico gruppo (Soggetti con RBD).

Il parametro semi-automatico (Automatic RWA) ha mostrato una correlazione positiva statisticamente significativa con REM fasico ($R=0.57$, $p<0.0001$), REM tonico ($R=0.53$, $p<0.0001$) e any REM ($R=0.62$, $p<0.0001$).

Le analisi delle curve ROC, effettuate tra i soggetti con RBD rispetto ai soggetti senza RBD, sono mostrate in Figura 7 e sono riassunte in Tabella 3, dove sono anche riportati i confronti statistici tra le diverse AUC rispetto all'Any REM che si è mostrato il parametro con AUC maggiore e che è stato quindi assunto come gold standard.

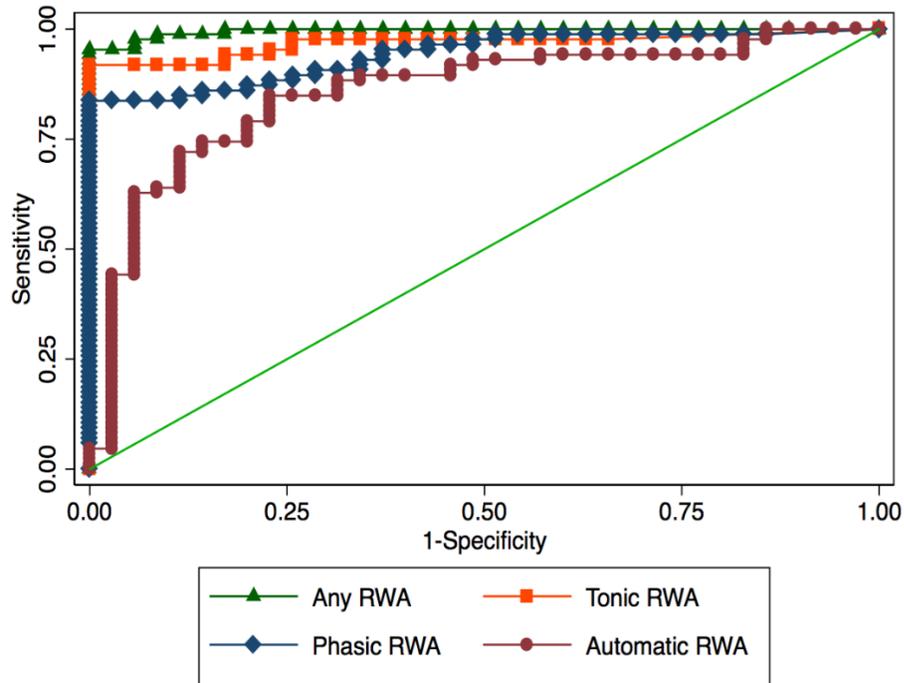


Figura 7: distribuzione dei dati su curve ROC, effettuate per ciascuno dei parametri utilizzati per definire l’RWA.

Tabella 3: analisi ROC dei parametri RWA. Confronto tra soggetti con RBD (iRBD e PD+RBD) e soggetti senza RBD (CTR e PDnoRBD)

	AUC	Errore standard	Intervallo di confidenza 95%		AUC vs Any REM (p value)
Any REM	0.9959	0.0029	0.99018	1.00000	n.a.
REM tonico	0.9670	0.0147	0.93815	0.99591	0.1894
REM fasico	0.9449	0.0185	0.90867	0.98112	0.0108
Automatic RWA	0.8551	0.0389	0.77898	0.93132	0.0007

Come si evince dalla tabella 3 il parametro REM tonico non ha mostrato una differenza statisticamente significativa rispetto all’Any

REM nella differenziazione di soggetti con RBD dai soggetti senza RBD. Al contrario, i parametri REM fasico e specialmente l'Automatic RWA sono risultati significativamente inferiori se paragonati all'Any REM.

I valori di Any REM e di Automatic RWA nei due gruppi di studio sono riportati in figura 8 e figura 9 rispettivamente.

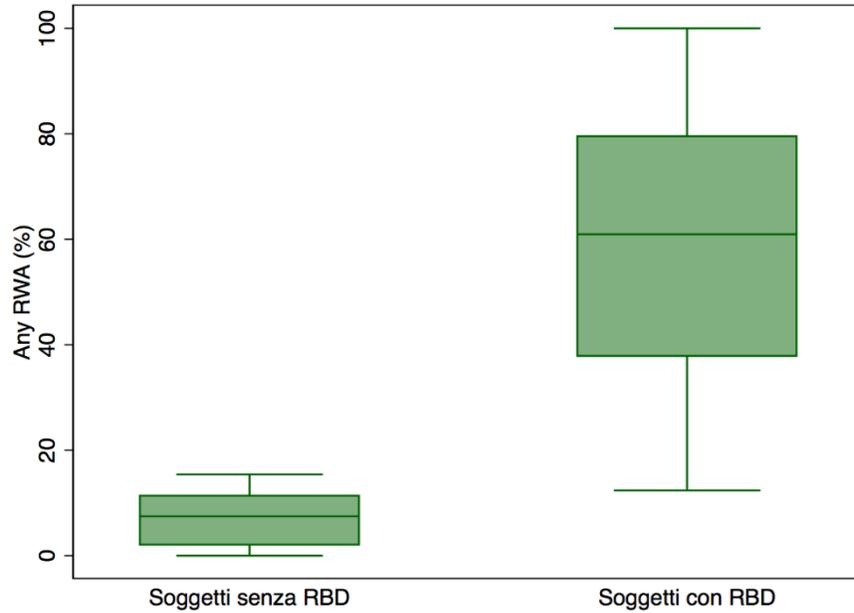


Figura 8: Box plot dei valori di Any REM, nei soggetti senza RBD (CTR e PDnoRBD) e nei soggetti con RBD (iRBD e PD+RBD).

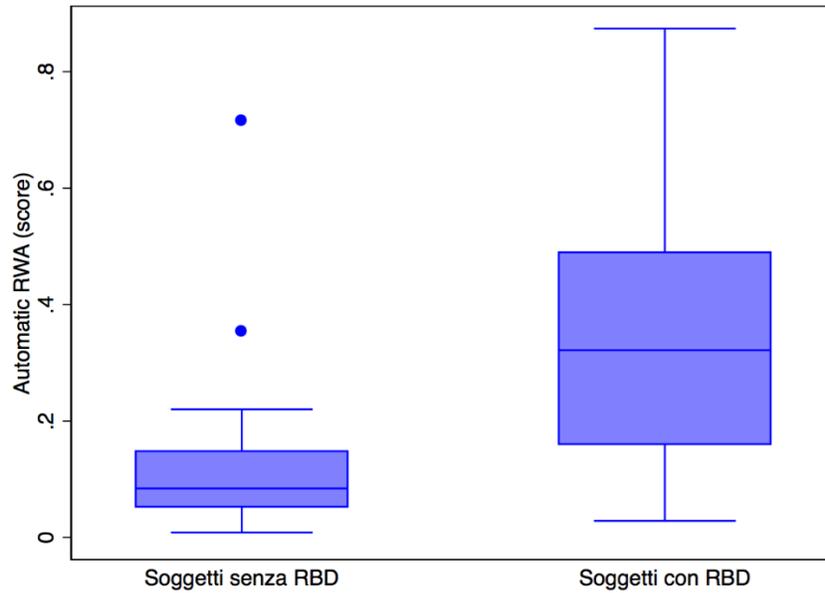


Figura 9: Box plot dei valori di Automatic RWA, nei soggetti senza RBD (CTR e PDnoRBD) e nei soggetti con RBD (iRBD e PD+RBD).

È stata effettuata inoltre una correlazione tra i due indici AHI (indice di apnea/ipopnea) e PLMI (periodic leg movement index) ed i parametri RWA. L'indice AHI non ha mostrato correlazione statisticamente significativa con l'attività muscolare in REM, mentre il PLM index ha mostrato correlazioni significative con il parametro Automatic RWA ($R=0.4261$, $p=0.0001$) e, seppur debolmente, con l'Any REM ($R=0.2802$, $p=0.0476$).

Non è stata riscontrata invece nessuna correlazione statisticamente significativa tra i parametri DAT-SPECT, sia come valore medio sia z score, ed i quattro parametri di RWA.

6. Discussione

Nel presente studio, sono state indagate quattro differenti metodiche di quantificazione dell'RWA, di cui tre visive e una semi-automatica, in gruppi di soggetti affetti da RBD, sia nella sua forma idiopatica sia associata a PD. Il singolo parametro che si è dimostrato migliore nel riconoscimento dell'RBD è l'Any REM, con un AUC di 0.99; questo però non si è mostrato significativamente superiore se comparato al REM tonico. Il parametro semi-automatico di quantificazione Automatic REM ha mostrato una buona capacità discriminativa, seppur significativamente inferiore se paragonata all'Any REM, con una AUC di 0.86.

Allo stato attuale sono stati sviluppati diversi software di quantificazione semi-automatica di RWA. Tali algoritmi hanno dimostrato una buona accuratezza nell'identificare i pazienti affetti da RBD, ed hanno mostrato risultati paragonabili tra loro, anche se differiscono nei parametri esplorati e nei valori di cut-off presi in considerazione. Queste nuove metodiche, al momento solamente utilizzate in ambito di ricerca, potrebbero rappresentare una importante risorsa nella diagnosi di RBD e, di conseguenza, nell'identificazione precoce di soggetti in stadio iniziale di sinucleinopatia, permettendo un'analisi rapida e standardizzata di grossi data-set di pazienti.

Il presente studio si proponeva dunque di validare l'utilizzo di un algoritmo semi-automatico di quantificazione dell'RWA in un esteso campione di soggetti con e senza RBD, indipendente rispetto al campione utilizzato per definire tale algoritmo. Il metodo che è stato impiegato è quello elaborato da Frandsen *et al* (57), ottimizzato per i parametri con il quale ha dimostrato una miglior capacità discriminativa tra soggetti con e senza RBD. Tali parametri sono il

risultato di una comparazione tra 648 diverse combinazioni per l'analisi di oltre un milione di eventi motori per ciascuna traccia motoria utilizzata. Questa metodica è stata la prima a comparare diversi tipi di baseline, mostrando una migliore accuratezza per la finestra mobile, che permette un adattamento del valore di baseline nel corso della notte in esame. Questo potrebbe essere particolarmente importante quando l'analisi avviene in pazienti PD in terapia farmacologica, nei quali avviene una fluttuazione della concentrazione dei farmaci, e quindi del loro effetto, durante le ore della registrazione. Inoltre, questo modello è stato il primo a testare e definire sistematicamente differenti valori temporali di separazione (IEI) e durata degli eventi. (57)

L'applicazione di questo algoritmo al campione indipendente di soggetti analizzati in questo studio ha mostrato un buon livello di accuratezza nella distinzione di pazienti con RBD dai non affetti da questo disturbo, con un valore di AUC pari a 0.86, superiore quindi a quella riportata precedentemente da Frandsen *et al* (AUC=0.81) (57), pur rimanendo sensibilmente inferiore al parametro visivo di quantificazione di RWA Any REM (AUC=0.99). L'accuratezza dell'algoritmo utilizzato è sostanzialmente paragonabile agli altri metodi semi-automatici riportati in letteratura (Mayer *et al* ha riportato una AUC di 0.82 (55), Ferri *et al* AUC=0.83 (56)).

Nel presente lavoro, si è scelto di utilizzare il metodo Frandsen, in quanto tale algoritmo è risultato significativamente correlato con quello di Kempfner *et al*, che sembra possedere la maggior capacità di identificazione della malattia e di separazione dai controlli sani (58). Tuttavia, il metodo di Kempfner è tecnicamente più complesso e non facilmente traducibile nella pratica clinica, in quanto richiede più derivazioni EMG (cinque invece di una) (58).

Tuttavia, nel presente studio, così come nello studio originale, la quantificazione semi-automatica della RWA proposta da Frandsen e collaboratori ha mostrato una buona, ma non perfetta capacità discriminatoria tra soggetti con e senza RBD, ed è risultato significativamente inferiore rispetto alla analisi visiva. Pertanto, l'analisi visiva rimane il gold standard per la diagnosi di RBD, e teoricamente il parametro semi-automatico potrebbe essere utilizzato come primo strumento di screening, in larghi data-set di pazienti, identificando ad esempio un cut-off che abbia massima sensibilità, ed andando poi ad escludere visivamente i falsi positivi.

Nel presente studio tutti i parametri di quantificazione di RWA sono risultati indipendenti dall'indice apnea-ipopnea. Questo dato assume rilevanza in quanto il russamento e gli episodi respiratori sonno-relati in pazienti affetti da disturbo di apnee ostruttive nel sonno (OSAS) comportano spesso artefatti che possono rendere più difficoltosa la quantificazione dell'RWA, specialmente quando viene utilizzato soltanto il muscolo mentale (47).

È invece emersa una correlazione tra il PLM index e i due parametri Any REM e Automatic REM, che è risultata più evidente per quest'ultimo. Questo sembra suggerire che il metodo semi-automatico abbia, rispetto all'analisi visiva, minor capacità di differenziare l'RWA dagli artefatti prodotti dal movimento degli arti nel disturbo da movimento periodico degli arti nel sonno (PLMD) (52), e potrebbe spiegare, almeno in parte, la minor accuratezza del metodo semi-automatico nella distinzione tra pazienti con RBD dai non affetti da questo disturbo.

Nessuno dei parametri motori indagati ha invece raggiunto la significatività statistica nella correlazione con i valori del caudato e

putamen alla DAT SPECT. Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura, in quanto la funzionalità dopaminergica nigrostriatale studiata tramite ^{123}I -FP-CIT-SPECT non ha mostrato correlazioni statisticamente significative né con l'età di insorgenza e la durata dell'RBD (86) né con l'attività EMG (87) (88). In un recente studio (89), anche la quantificazione dell'RWA tramite la metodica semi-automatica di Ferri *et al.* ha mostrato analoghi risultati 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 quindi che esista una diversa patogenesi dopaminergica in questo disturbo.

Questo studio presenta alcuni limiti. In primo luogo, è stata impiegata ed analizzata una sola metodica semi-automatica. L'utilizzo di più algoritmi nello stesso gruppo di soggetti permetterebbe un confronto maggiormente realistico della loro efficacia e una valutazione più accurata della loro capacità di quantificazione dell'RWA rispetto all'analisi visiva. Tuttavia, in un precedente studio i diversi algoritmi di quantificazione di RWA prima citati sono stati confrontati in uno stesso gruppo di pazienti (90), e non è stato possibile individuare tra questi l'algoritmo ottimale per il rilevamento di RWA, in quanto le performance osservate cambiavano in rapporto ai gruppi di pazienti che questi algoritmi erano tenuti a distinguere. In tale studio infatti sono stati operati confronti non solo tra pazienti con RBD e controlli sani ma anche soggetti affetti da altre patologie tra cui PLMD e PD. Inoltre, la sensibilità e specificità media riportata per tutti gli algoritmi confrontati è generalmente risultata sotto l'80%, supportando la tesi che le metodiche semi-automatiche finora sviluppate possano

rappresentare strumenti di supporto e non strumenti diagnostici autonomi.

Il secondo limite del presente studio è che i pazienti analizzati appartengono a un unico centro. Un'integrazione di pazienti provenienti da centri differenti avrebbe consentito non soltanto di disporre di un numero maggiore di soggetti, ma anche di poter attuare un confronto diretto tra le due popolazioni e valutare un eventuale impatto della diversa strumentazione e software utilizzati per la registrazione polisonnografica sulla quantificazione semi-automatica dell'RWA. Infine, per quanto riguarda il confronto dei parametri di RWA con l'attività dopaminergica nigrostriatale, l'utilizzo della analisi DAT SPECT come sola metodica di neuroimaging potrebbe non essere sufficiente per evidenziare il substrato fisiopatologico della RWA. Sarebbe pertanto interessante utilizzare altre metodiche di neuroimaging, quali ad esempio PET con traccianti di altri sistemi corticali o recettoriali, al fine di meglio studiare i correlati fisiopatologici dell'attività motoria eccessiva in REM dei pazienti affetti da RBD.

7. Conclusioni

I risultati del presente studio suggeriscono che la metodica semi-automatica di quantificazione del sonno REM senza atonia (RWA), sviluppata da Frandsen *et al.*, ha una buona accuratezza nel riconoscimento del disturbo comportamentale del sonno REM, anche quando applicata ad un campione indipendente di soggetti. L'utilizzo esteso in ambito clinico di questa metodica potrebbe comportare notevoli vantaggi quali velocizzare e standardizzare l'analisi dell'attività muscolare durante il sonno, tuttavia la significativa superiorità del metodo visivo riscontrata nel presente studio

suggerisce che queste metodiche semi-automatiche non possano, allo stato attuale, sostituirsi interamente allo scoring visivo, che dovrebbe essere quindi considerato il gold standard per la diagnosi di RBD.

8. Bibliografia

1. *Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia.* **Schenck CH, Bundlie SR, Ettinger M, Mahowald MW.** 1986, *Sleep*, pp. 9: 293-308.
2. *International Classification of Sleep Disorders. Third Edition (ICSD-3).* **American Academy of Sleep Medicine.** 2014.
3. *Principles of Neural Science 5th Edition.* **Kandel E., Schwartz J., Jessell T., Siegelbaum S. & Hudspeth A. J.** 2013. New York : Health Professions Divisions.
4. *Video analysis of motor events in REM sleep behavior disorder.* **Frauscher B., Gschliesser V., Brandauer E., Ulmer H., Peralta C.M., Müller J., Poewe W., Högl B.** 2007, *Mov. Disord*, p. 22:1464–1470.
5. *REM sleep behavior disorder: updated review of the core features, the RBD-Neurodegenerative Disease Association, evolving concepts, controversies, and future directions.* **Boeve BF, et al.** 2010, *Annals of the New York Academy of Science*, p. 1184: 15–54.
6. *Idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder: diagnosis, management, and the need for neuroprotective interventions.* **Iranzo, A., Santamaria, J. & Tolosa, E.** 2016, *Lancet Neurol.*, p. 15, 405–419.
7. *Presynaptic dopaminergic neuroimaging in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis.* **Bauckneht M, Chincarini A, De Carli F et al.** 2018, *Sleep Med Rev*, p. 41:266-274.

8. *Idiopathic rapid eye movement sleep disorder: associations with antidepressants, psychiatric diagnoses, and other factors, in relation to age of onset.* **Teman PT, Tippmann-Peikert M, Silber MH, Slocumb NL, Auger RR.** 2009, *Sleep Medicine*, p. 60–65.
9. *Lesional REM sleep behavior disorder localizes to the dorsomedial pons.* **St Louis EK, McCarter SJ, Boeve BF et al.** 2014, *Neurology*, p. 83(20):1871-1873.
10. *REM sleep behavior disorder: Motor manifestations and pathophysiology.* **Arnulf, I. et al.** 2012, *Mov Disord*, p. 27(6):677-689.
11. *Neurophysiology of the states of sleep.* **Jouvet, M. et al.** 1967, *Physiological Reviews*, p. 47(2):117-77.
12. *Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study.* **Sakai K, Sastre JP, Salvert D, Touret M, Tohyama M, Jouvet M.** 1979, *Brain Research*, p. 233-254.
13. *Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease.* **Boeve BF, Silber MH, Saper CB, Ferman TJ, Dickson DW, Parisi JE, et al.** 2007, *Brain*.
14. *Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder.* **Peever J, Luppi P-H, Montplaisir J.** 2014, *Trends Neuroscience*, p. 37(5):279-288.
15. *A case of REM sleep behavior disorder with autopsy-confirmed alzheimer's disease: postmortem brain stem histochemical analyses.* **Schenck CH, Garcia-Rill E, Skinner RD, Anderson ML, Mahowald MW.** 1996, *Biol Psychiatry*, p. 40(5):422-425.
16. *Degeneration of rapid eye movement sleep circuitry underlies rapid eye movement sleep behavior disorder.* **McKenna D, Peever J.** 2017, *Movement Disorders*, p. 32(5):636-644.

17. *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology.* **Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K.** 2004, *Cell Tissue Res*, p. 318, 121–134.
18. *Restoration of normal motor control in Parkinson's disease during REM sleep.* **De Cock VC, Vidailhet M, Leu S, et al.** 2007, *Brain*, p. 130(2):450-456.
19. *Ictal SPECT in patients with rapid eye movement sleep behaviour disorder.* **Mayer G, Bitterlich M, Kuwert T, Ritt P, Stefan H.** 2015, *Brain*, p. 138(Pt 5): 1263-70.
20. *Prodromal Parkinsonism and Neurodegenerative Risk Stratification in REM Sleep Behavior Disorder.* **Barber, Thomas R.** 2017, *Sleep*, p. 40.
21. *Prevalence and determinants of REM sleep behavior disorder in the general population.* **Haba-Rubio J, Frauscher B, Marques-Vidal P, Toriel J, Tobback N,.** 2018, *Sleep*, p. 108.
22. *Pharmacologically induced/exacerbated restless legs syndrome,, periodic limb movements of sleep, and REM behavior disorder/REM sleep without atonia: literature review, qualitative scoring, and comparative analysis.* **Hoque, R., Chesson, A.L.** 2010, *J.Clin. Sleep Med.*, p. 6 (1), 79-83.
23. *Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases.* **Olson EJ, Boeve BF, Silber MH.** 2000, *Brain*, p. 331–339.
24. *REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP.* **Schenck CH, Mahowald MW.** 2002, *Sleep*, p. 25(2):120-138.
25. *Motor dyscontrol in sleep of narcoleptic patients (a lifelong development?).* **Mayer G., Meier-Ewert K.** 1993, *J. Sleep Res.*, p. 143–148.
26. *Environmental risk factors for REM sleep behavior disorder A multicenter case- control study.* **Postuma R.B., Montplaisir J.Y., Pelletier A., Dauvilliers Y., Oertel W., Iranzo A., Ferini-Strambi L., Arnulf I., Hogl B., Manni R.,**

Miyamoto T., Mayer G., Stiasny-Kolster K., Puligheddu M., Ju Y., Jennum P., Sonka K., Santamaria J. 2012, *Neurology*, p. 79, 428–434.

27. *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention.*

Ascherio, A. & Schwarzschild, M. A. 2016, *Lancet Neurology*, p. 15, 1257–1272.

28. *Comorbidity and medication in REM sleep behavior disorder. A multicenter case-control study.* **Frauscher B, et al.** 2014, *Neurology*, p. 82, 1076–1079.

29. *Prodromal Parkinsonism and Neurodegenerative Risk Stratification in REM Sleep Behavior Disorder.* **Barber TR, Lawton M, Rolinski M, et al.** 2017, *Sleep*, p. 40(8).

30. *Idiopathic REM sleep behavior disorder and neurodegenerative risk: To tell or not to tell to the patient? How to minimize the risk?* **Arnaldi D, Antelmi E, St. Louis EK, Postuma RB, Arnulf I.** 2017, *Sleep Med Rev.*, p. 36:82-95.

31. *Parkinson risk in idiopathic REM sleep behavior.* **Postuma R.B., Gagnon J.F., Bertrand J.A., Genier Marchand D.** 2015, *Neurology*, p. 84(11):1104-13.

32. *Predictive markers for early conversion of iRBD to neurodegenerative synucleinopathy diseases.* **Li Y, Kang WK, Yang Q, Zhang L, Zhang L, Dong F, et al.** 2017, *Neurology*, p. 88(16):1493-1500.

33. *Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study.* **Postuma R.B., Iranzo A., Hu M., Högl B., Boeve B.F., Manni R., Oertel W.H., Arnulf I., Ferini-Strambi L., Puligheddu M., Antelmi E., Cochen De Cock V., Arnaldi D., Mollenhauer B., Videnovic A., Sonka K., Jung K.Y., Kunz D., Dauvilliers Y.** 2019, *Brain*, p. 142(3):744-759.

34. *Clinicopathologic correlations in 172 cases of rapid eye movement sleep behavior disorder with or without a coexisting neurologic disorder.* **Boeve BF, et al.** 2013, *Sleep Med.*, p. 14, 754–762.

35. *Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease.* **Tolosa E, Gaig C, Santamaria J, Compta Y.** 2009, *Neurology*, p. 72:S12–S20.
36. *Olfaction and color vision identify impending neurodegeneration in rapid eye movement sleep behavior disorder.* **Postuma R.B., Gagnon J-F., Vendette M., Desjardins C., Montplaisir J.Y.** 2011, *Ann Neurol.*, p. 69(5):811-818.
37. *Dopaminergic imaging and clinical predictors for phenocconversion of REM sleep behaviour disorder.* **Arnaldi D, Chincarini A, Hu MT, Sonka K, Boeve B, Miyamoto T, et al.** 2021, *Brain*, p. 144(1): 278-87.
38. *Idiopathic REM sleep behaviour disorder in the development of Parkinson's disease.* **Boeve BF, et al.** 2013, *Lancet Neurology*, p. 12(5):469-482.
39. *The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior disorder in neurodegenerative diseases.* **Iranzo A, Santamaria J, Tolosa E.** 2009, *Sleep Med Rev*, p. 13(6):385-401.
40. *A motor signature of REM sleep behavior disorder.* **Oudiette D, Leu-Semenescu S, Roze E, et al.** 2011, *Movements Disorders*, p. 27(3):428-31.
41. *Sleep-related violence, injury, and REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease.* **Comella CL, Nardine TM, Diederich NJ, Stebbins GT.** 1998, *Neurology*, p. 51(2):526.
42. *REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP.* **Schenck CH, Mahowald MW.** 2002, *Sleep*, p. 25(2):120-138.
43. *Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease.* **Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Montplaisir JY.** 2009, *Brain J Neurol.*, p. 132(Pt 12):3298-3307.
44. *Motor events during healthy sleep: a quantitative polysomnographic study.* **Frauscher B, Gabelia D, Mitterling T, Biermayr M, Bregler D, Ehrmann L, et al.** 2014, *Sleep*, p. 37:763e73.

45. *Long-term follow-up investigation of isolated rapid eye movement sleep without atonia without rapid eye movement sleep behavior disorder: a pilot study.* **Stefani A, Gabelia D, Hogl B, Mitterling T, Mahlknecht P, Stockner H, et al.** 2015, *J Clin Sleep Med*, p. 11:1273-9.
46. *Diagnosis of REM sleep behavior disorder by video-polysomnographic study: is one night enough?* **Zhang J, et al.** 2008, *Sleep*, p. 31, 1179–1185.
47. *Normative EMG values during REM sleep for the diagnosis of REM sleep behavior disorder.* **Frauscher B., Iranzo A. Gaig C.** 2012, *Sleep*, p. 35, 835–847.
48. *Polysomnographic diagnosis of idiopathic REM sleep behavior disorder.* **Montplaisir J, Gagnon JF, Fantini ML, Postuma RB, Dauvilliers Y, Desautels A, Rompré S, Paquet J.** 2010, *Mov Disord.*, p. 25(13):2044-51.
49. *Defining muscle activities for assessment of rapid eye movement sleep behavior disorder: from a qualitative to a quantitative diagnostic level.* **Frauscher B, Ehrmann L, Högl B.** 2013, *Sleep Med.* 14,, p. 14, 729–733.
50. **Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan S.** *The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications (1st Ed).* Westchester : American Academy of Sleep Medicine, 2007.
51. *Usefulness of the SINBAR EMG montage to detect the motor and vocal manifestations occurring in REM sleep behavior disorder.* **Iranzo A, Frauscher B, Santos H, et al.** 2011, *Sleep Medicine*, p. 12:284-8.
52. *Quantification of EMG activity during sleep: a phasic EMG metric.* **Bliwise DL, He L, Ansari FP, Rye DB.** 2006, *Journal of Clinical Neurophysiology*, p. 23:59-67.
53. *Melatonin therapy for REM sleep behavior disorder: a critical review of evidence.* **McGrane IR, Leung JG, St Louis EK, Boeve, BF.** 2015, *Sleep Med*, p. 16, 19–26.

54. *REM sleep behaviour disorder*. **Dauvilliers Y, Schenck CH, Postuma RB, Iranzo A, Luppi PH, Plazzi G, Montplaisir J, Boeve B**. 2018 , Nat Rev Dis Primers., p. 30;4(1):19.
55. *Quantification of tonic and phasic muscle activity in REM sleep behavior disorder*. **Mayer, G. et al**. 2008, J. Clin. Neurophysiol., p. 25, 48–55.
56. *Comparison between an automatic and a visual scoring method of the chin muscle tone during rapid eye movement sleep*. **Ferri R, Gagnon J, Postuma RB, Rundo F, Montplaisir JY**. 2014, Sleep Med, p. 15, 661–665.
57. *Analysis of automated quantification of motor activity in REM sleep behaviour disorder*. **J. Frandsen, R., Nikolic, M., Zoetmulder, M., Kempfner, L. & Jennum, P**. 2015, J. Sleep Res., p. 24, 583–590.
58. *REM behaviour disorder detection associated with neurodegenerative diseases*. **Kempfner J, Sorensen G, Zoetmulder M, Jennum P, Sorensen HB**. 2010, Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc., p. 2010:5093-6.
59. *Validation of semiautomatic scoring of REM sleep without atonia in patients with RBD*. **Guttowski D, Mayer G, Oertel WH, Kesper K, Rosenberg T**. 2018, Sleep Med., p. 46:107-113.
60. *MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease*. **Berg D, Postuma RB, Adler CH, et al**. 2015, Mov Disord Off J Mov Disord Soc, p. 30(12):1600-1611.
61. *Decreased striatal dopaminergic innervation in REM sleep behavior disorder*. **Albin RL, Koeppe RA, Chervin RD, Consens FB, Wernette K, Frey KA, et al**. 2000, Neurology , p. 55:1410e2.
62. *Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. Comparison with Parkinson's disease and controls*. **Eisensehr I., Linke R., Noachtar S., Schwarz J., Gildehaus FJ, Tatsch K**. 2000, Brain, p. 1155e60.

63. *SPECT imaging of the dopaminergic system in (premotor) Parkinson's disease.* **Booij J, Knol RJJ.** . 2007, *Parkinsonism Relat Disord*, p. 13:S425-S428.
64. *Recent advances in imaging of dopaminergic neurons for evaluation of neuropsychiatric disorders.* **Shen LH., Liao MH., Tseng YC.** 2012, *J Biomed Biotechnol*, p. 2012:2593-49.
65. *The role of DAT-SPECT in movement disorders.* **Kägi G, Bhatia KP, Tolosa E.** 2010, *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, p. 81(1):5.
66. *Imaging synucleinopathies.* **Brooks DJ, Tamsasco, N.** 2016, *Movement Disorder*, p. 31(6):814-29.
67. *Striatal dopamine in Parkinson disease: a meta-analysis of imaging studies.* **Kaasinen V., Vahlberg T.** 2017, *Ann Neurol*, p. 82:873–882.
68. *Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease.* **Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, et al.** 2013, *Brain*, p. 136:2419–2431.
69. *Nuclear Imaging in the Diagnosis of Clinically Uncertain Parkinsonian Syndromes.* **Buchert R, Buhmann C, Apostolova I, Meyer PT, Gallinat J.** 2019, *Dtsch Arztebl Int.*, p. 116(44):747-754.
70. *Accurate differentiation of parkinsonism and essential tremor using visual assessment of [123I]-FP-CIT imaging: the [123I]-FP-CIT study group.* **Benamer, T.S., Patterson, J., Grosset, D.G., et al.** 2000, *Movement Disorder*, p. 15, 503–510.
71. *Correlation of striatal dopamine transporter imaging with post mortem substantia nigra cell counts.* **Kraemmer J, Kovacs GG, Perju-Dumbrava L, Pirker S, Traub-Weidinger T, Pirker W.** 2014, *Movement Disorder*, p. 29 (14), 1767–1773.
72. *Amnesic mild cognitive impairment in Parkinson's disease: a brain perfusion SPECT study.* **Nobili F, Abbruzzese G, Morbelli S, Marchese R, Girtler N, Dessi B, et al.** 2009, *Movement Disorder*, p. 24: 414–21.

73. *What predicts cognitive decline in de novo Parkinson's disease?* . **Arnaldi D, Campus C, Ferrara M, Fama F, Picco A, De Carli F, et al.** 2012, *Neurobiol Aging*, p. 33(6): 1127 e11-20.
74. *Clinical variables and biomarkers in prediction of cognitive impairment in patients with newly diagnosed Parkinson's disease: a cohort study.* **Schrag A, Siddiqui UF, Anastasiou Z, Weintraub D, Schott JM.** 2016, *Lancet Neurology*, p. 16: 66–75.
75. *Brain imaging findings in idiopathic REM sleep behavior disorder (RBD) - a systematic review on potential biomarkers for neurodegeneration.* **Heller, J., Brcina, N., Dogan, I., Holtbernd, F., Romanzetti, S., Schulz, J.B., Schiefer, J., Reetz, K.** 2016, *Sleep Medicine Reviews*, p. pii: S1087-0792(16)30057-0.
76. *Dopamine transporter imaging deficit predicts early transition to synucleinopathy in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder.* **Iranzo, A. et al.** 2017, *Ann. Neurol.* , p. 82, 419–428.
77. *Serial dopamine transporter imaging of nigrostriatal function in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study.* **Iranzo A., Valldeoriola F., Lomena F., Molinuevo J.L., Serradell M., Salamero M., et al.** 2011, *Lancet Neurol*, p. 10(9):797-805.
78. *The role of the serotonergic system in REM sleep behavior disorder.* **Arnaldi D., Fama F., De Carli F., Morbelli S., Ferrara M., Picco A., et al.** . 2015, *Sleep*, p. 38(9): 1505-9.
79. *SNM practice guideline for dopamine transporter imaging with 123I-ioflupane SPECT1.0.* **Djang DS, Janssen MJ, Bohnen N, Booij J, Henderson TA Herholz K et al.** 2012, *J Nucl Med*, p. 53(1):154-63.
80. *Nigro-caudate dopaminergic deafferentation: a marker of REM sleep behavior disorder?* **Arnaldi D, De Carli F, Picco A, et al.** 2015, *Neurobiol Aging.*, p. 6(12):3300-3305.
81. *MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease.* **Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K,**

Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH DG. 2015 , *Mov Disord.*, p. 30(12):1591-601.

82. *Validation of the Mayo Sleep Questionnaire to screen for REM sleep behavior disorder in an aging and dementia cohort.* **Boeve BF, Molano JR, Ferman TJ et al.** 2011, *Sleep Med.*, p. 12(5):445-453.

83. *EANM procedure guidelines for brain neurotransmission SPECT using (123)I-labelled dopamine transporter ligands, version 2.* **Darcourt J, Booij J, Tatsch K, et al.** 2010, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, p. 37(2):443-450.

84. *Automatic semi-quantification of [123I]FP-CIT SPECT scans in healthy volunteers using BasGan version 2: results from the ENC-DAT database.* **Nobili F, Naseri M, De Carli F, et al.** 2013, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, p. 40(4):565-573.

85. *The basal ganglia matching tools package for striatal uptake semi-quantification: description and validation.* **Calvini P, Rodriguez G, Inguglia F, Mignone A, Guerra UP, Nobili F.** 2007, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, p. 34(8):1240-1253.

86. *Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperechogenicity as risk markers of synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study.* **Iranzo A, Lomeña F, Stockner H, Valldeoriola F, Vilaseca I, Salamero M, Molinuevo JL, Serradell M, Duch J, Pavía J, Gallego J, Seppi K, Högl B, Tolosa E, Poewe W, Santamaria J.** 2010, *Lancet Neurol.*, p. 9(11):1070-7.

87. *The implication of nigrostriatal dopaminergic degeneration in the pathogenesis of REM sleep behavior disorder.* **Kim YK, Yoon IY, Kim JM, Jeong SH, Kim KW, Shin YK, Kim BS, Kim SE.** 2010, *Eur J Neurol.*, p. 17(3):487-92.

88. *Early diagnosis of Lewy body disease in patients with late-onset psychiatric disorders using clinical history of rapid eye movement sleep behavior disorder and [123 I]-metaiodobenzylguanidine cardiac*

scintigraphy. **Fujishiro H, Okuda M, Iwamoto K, Miyata S, Torii Y, Iritani S, Ozaki N.** 2018, *Psychiatry Clin Neurosci.*, p. 72(6):423-434.

89. *REM Sleep without atonia correlates with abnormal vestibular-evoked myogenic potentials in isolated REM sleep behavior disorder*. **Puligheddu M, Figorilli M, Serra A, Laccu I, Congiu P, Tamburrino L, de Natale ER, Ginatempo F, Deriu F, Loi G, Fantini ML, Schenck CH, Ferri R.** 2019, *Sleep*, p. 42(9):zsz128.

90. *Comparison of computerized methods for rapid eye movement sleep without atonia detection*. **Cesari M, Christensen JAE, Kempfner L, Olesen AN, Mayer G, Kesper K, Oertel WH, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Sorensen HBD, Jennum P.** 2018, *Sleep*, p. 41(10).

91. *A discrete pontine ischemic lesion could cause REM sleep behavior disorder*. **Kimura K, Tachibana N, Kohyama J, Otsuka Y, Fukazawa S, Waki R.** 2000, *Neurology*, p. 849-5.

92. *Status dissociatus after surgery for tegmental ponto-mesencephalic cavernoma: a state-dependent disorder of motor control during sleep*. **Provini F, Vetrugno R, Pastorelli F, Lombardi C, Plazzi G, Marliani A.** 2004, *Movement Disorder*, p. 719-23.

93. *Diagnostic Thresholds for Quantitative REM Sleep Phasic Burst Duration, Phasic and Tonic Muscle Activity, and REM Atonia Index in REM Sleep Behavior Disorder with and without Comorbid Obstructive Sleep Apnea*. **Stuart J. McCarter, BA, Erik K. St. Louis, MD, Ethan J. Duwell, BA, Paul C. Timm, BS, David J. Sandness, BA, Bradley F. Boeve, MD, Michael H. Silber, MBChB.** 2014, *Sleep*, p. 1649–1662.

94. *REM sleep behavior disorder initiated by acute brainstem multiple sclerosis*. **Tippmann-Peikert M, Boeve B, Keegan B.** 2006, *Neurology*, p. 66(8):1277-9.

95. *Polysomnographic features of REM sleep behavior disorder: development of a scoring method*. **Lapierre O, Montplaisir J.** 1992, *Neurology*, p. 42(7):1371-4.

