UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze

Corso di Laurea Triennale in Tecniche di Neurofisiopatologia

Presidente: Prof. A. Antonini

EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE TRANSCRANICA A CORRENTE ALTERNATA CEREBELLARE SULLA BRADICINESIA NELLA MALATTIA DI PARKINSON

Relatore: Dott. A. Guerra

Correlatrice: Dr.ssa V. D'Onofrio

Laureanda: Matilde Rossi

Matricola: 2084451

Anno accademico 2024/2025

INDICE

1 - ABBREVIAZIONI **4**

2 - ABSTRACT **5**

3 - INTRODUZIONE **6**

3.1 - LA MALATTIA DI PARKINSON 6

3.1.1 - EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA 6

3.1.2 - PATOGENESI E FISIOPATOLOGIA 6

3.1.3 - CARATTERISTICHE CLINICHE 12

3.1.4 - DIAGNOSI 14

3.1.5 - STADI DELLA MALATTIA 15

3.1.6 - TERAPIA 16

3.2 - tACS 18

3.2.1 - DEFINIZIONE E MECCANISMO D'AZIONE 18

3.2.2 - COMPONENTI DELLA tACS E TARGET DELLA STIMOLAZIONE 18

3.2.3 - tACS CEREBELLARE 20

4 - OBIETTIVI DELLO STUDIO **22**

5 - MATERIALI E METODI **23**

5.1 - PARTECIPANTI 23

5.2 - tACS 24

5.3 - VALUTAZIONE CINEMATICA 25

5.4 - DISEGNO SPERIMENTALE 25

5.5 - ANALISI STATISTICA 27

6 - RISULTATI **28**

6.1 - DIFFERENZE TRA HC E PAZIENTI CON MP 28

6.2 - ANALISI EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE tACS E DEL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO 28

6.3 - CORRELAZIONI CLINICO-NEUROFISIOLOGICHE 31

7 - DISCUSSIONE **33**

7.1 - FATTORI CONFONDENTI E POSSIBILI LIMITAZIONI DELLO STUDIO 35

8 - CONCLUSIONI **37**

Bibliografia **38**

1 - ABBREVIAZIONI

BDI-II: Beck Depression Inventory II

DBS: Deep Brain Stimulation

ET: tremore essenziale

FAB: Frontal Assessment Battery

GPe: Globo Pallido esterno

GPi: Globo Pallido interno

M1: corteccia motoria primaria

MDS-UPDRS: Movement Disorder Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale

MoCA: Montreal Cognitive Assessment

MP: malattia di Parkinson

NdB: Nuclei della base

NIBS: stimolazione cerebrale non invasiva

NMS: Sintomi non motori

NST: Nucleo Subtalamico

PET: Tomografia a emissione di positroni

SNc: Substantia nigra pars compacta

SNA: sistema nervoso autonomo

tACS: stimolazione transcranica a corrente alternata

tDCS: stimolazione transcranica a corrente continua

TMS: stimolazione magnetica transcranica

2 - ABSTRACT

La stimolazione transcranica a corrente alternata (tACS) è una tecnica di neuromodulazione non invasiva, che ha mostrato effetti clinici positivi in pazienti affetti da malattia di Parkinson (MP). Tuttavia, nonostante il cervelletto abbia un ruolo rilevante nella fisiopatologia della malattia, nessuno studio ha indagato gli effetti della tACS cerebellare sui sintomi motori della malattia. L'obiettivo dello studio è stato verificare i possibili effetti della tACS cerebellare applicata alle frequenze θ e β sulla bradicinesia, sintomo cardine della MP. In questo studio randomizzato e in doppio cieco, sono stati arruolati diciassette pazienti affetti da MP valutati in una singola sessione sperimentale, in due condizioni farmacologiche: 1) dopo almeno 12 ore dall'ultima assunzione di levodopa (fase OFF); 2) dopo 1 ora dall'assunzione della levodopa (fase ON). Sono stati inoltre inclusi 20 soggetti sani di controllo (HC). La tACS è stata erogata sull'emisfero cerebellare omolaterale al lato più bradicinetico utilizzando le frequenze θ (5 Hz) e β (20 Hz), e una condizione di controllo (sham), in ordine randomizzato. Durante la stimolazione, sono stati valutati oggettivamente vari aspetti della bradicinesia (ampiezza, velocità, ritmo e riduzione progressiva di ampiezza durante movimenti ripetuti) tramite registrazioni cinematiche del movimento di *finger tapping* (15 secondi consecutivi) mediante un sistema optoelettronico. In fase OFF, i pazienti mostravano diverse alterazioni del movimento rispetto ai HC, ovvero ampiezza e velocità ridotte, minore regolarità del movimento e progressiva riduzione di ampiezza durante il task (effetto sequenza). La tACS cerebellare ha modulato alcuni aspetti della bradicinesia, in modo frequenza-specifico: è stato osservato un miglioramento dell'effetto sequenza e un peggioramento del ritmo del movimento solamente quando la stimolazione era erogata a frequenza θ. Al contrario, l'ampiezza e la velocità del movimento non sono state modulate durante tACS, dimostrando un effetto parametro-specifico. Infine, la levodopa ha migliorato l'ampiezza e la velocità del movimento, ma non si sono evidenziate interazioni significative tra l'effetto del farmaco e della tACS. I risultati dimostrano che la tACS cerebellare erogata a frequenza θ può migliorare specifici aspetti della bradicinesia nella MP, ovvero l'effetto sequenza. Tuttavia, questo effetto si verifica a discapito di un peggioramento del ritmo del movimento. Gli effetti osservati sono indipendenti dalla presenza dell'effetto farmacologico della levodopa. È possibile ipotizzare che la tACS cerebellare agisca primariamente sui meccanismi di temporizzazione e coordinazione del movimento, mentre parametri come ampiezza e velocità siano codificati da altre regioni cerebrali. Infine, i dati suggeriscono che le oscillazioni θ a livello cerebellare abbiano un ruolo nella fisiopatologia della bradicinesia, potenzialmente di tipo compensatorio. La θ-tACS cerebellare potrebbe contribuire a nuove strategie terapeutiche mirate per i sintomi motori della MP, come complemento alla terapia farmacologica.

3 - INTRODUZIONE

3.1 - LA MALATTIA DI PARKINSON

3.1.1 - EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa cronica a decorso progressivo, seconda in prevalenza solo alla malattia di Alzheimer, caratterizzata da prevalenti sintomi motori (bradicinesia, rigidità e tremore a riposo) e numerosi sintomi non-motori [1]. È una delle principali cause di disabilità neurologica: oltre 6 milioni di persone nel mondo sono affette e le stime indicano che questo numero è destinato a raddoppiare nei prossimi 30 anni [2].

La prevalenza è dell'1-2% nella popolazione con meno di 60 anni e del 3-5% nei soggetti di età superiore. La malattia è più frequente negli uomini che nelle donne, con un rapporto maschi-femmine 3:2. L'eziologia della MP è complessa e multifattoriale: fattori genetici, interagiscono con fattori ambientali, tra cui l'esposizione a pesticidi e metalli pesanti. L'invecchiamento rappresenta il principale fattore di rischio, contribuendo alla vulnerabilità neuronale [3], mentre risultano fattori protettivi la regolare assunzione di caffeina e l'abitudine tabagica [4]. Nel 90% dei casi, la MP si presenta come patologia sporadica acquisita, ma esistono forme ereditarie, di tipo monogenico (mutazione dei geni PARK1, PARK2, PARK6, PARK7, PARK8, LRRK2, ecc.). Queste varianti, a trasmissione autosomica dominante o recessiva, rappresentano il restante 10% dei casi e sono caratterizzate da un'età d'esordio più precoce, solitamente inferiore ai 45 anni. [4]

La MP è un disturbo clinicamente eterogeneo, a prognosi variabile. Un'analisi *post-mortem* effettuata su pazienti affetti da MP ha riscontrato che generalmente i soggetti vivono da 6,9 a 14,3 anni dopo la diagnosi [5].

3.1.2 - *PATOGENESI E FISIOPATOLOGIA*

La fisiopatologia della MP è definita da due caratteristiche principali, la cui presenza all'esame anatomo-patologico consente di formulare la diagnosi certa.

La prima è la perdita dei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della Substantia Nigra (SNc), localizzata nella regione ventrale del mesencefalo. Tale degenerazione neuronale causa una riduzione della trasmissione dopaminergica a livello dello striato, una delle strutture fondamentali dei nuclei della base (NdB) [6].

La seconda è la presenza di depositi intracellulari costituiti da aggregati di alfa-sinucleina ripiegata in modo anomalo (*misfolded*), noti come corpi di Lewy. L'accumulo di alpha-sinucleina, capace di propagarsi da cellula a cellula, inizierebbe nel nucleo motore dorsale del vago e nel bulbo olfattorio per poi estendersi secondariamente al mesencefalo, coinvolgendo i NdB e l'area tegmentale ventrale [7].

3.1.2.1 I nuclei della base e i circuiti Cortico-Striato-Pallido-Talamo-Corticale

I NdB sono un gruppo di nuclei cerebrali sottocorticali ampiamente interconnessi tra loro e comprendono il globo pallido, distinto in globo pallido interno (GPi) e globo pallido esterno (GPe); lo striato, ulteriormente diviso in caudato e putamen; il nucleo subtalamico (STN), l'unico tra i nuclei della base a dare origine a proiezioni eccitatorie e la *Substantia Nigra* (SN), costituita da una *pars compacta* (SNc) ed una *pars reticulata* (SNr). Lo striato riceve afferenze da diverse regioni corticali e dal talamo [8]. Le efferenze dai gangli della base originano nel Gpi e nella SNr e proiettano al talamo, modulando l'attività corticale, e al tronco encefalico [8].

Queste strutture rappresentano i principali componenti del circuito Cortico-Striato-Pallido-Talamo-Corticale, ossia un complesso network che contribuisce al processamento e modulazione delle informazioni per il controllo del movimento volontario, l'apprendimento, la cognizione e il controllo delle emozioni.

Le due vie deputate al controllo del movimento sono la via diretta e la via indiretta [9]. La via diretta dei gangli della base facilita l'esecuzione del movimento attraverso un meccanismo di feedback positivo: inibendo l'attività del complesso Gpi/SNr, riduce l'inibizione sul talamo, promuovendo l'attivazione della corteccia motoria [10]. La via indiretta ha invece un effetto opposto: i neuroni striatali inibiscono il Gpe, che normalmente sopprime il STN. Questa disinibizione del STN porta a una sua maggiore attività eccitatoria sul complesso Gpi/SNr, aumentando l'inibizione sul talamo, ostacolando l'inizio e il mantenimento del movimento [10]. Infine, la via iperdiretta consente alla corteccia di attivare direttamente il STN, che a sua volta eccita rapidamente il complesso Gpi/SNr. Questo meccanismo inibisce il talamo in modo rapido e transitorio, contribuendo al controllo e all'ottimizzazione della selezione dei movimenti [11]. Nella MP, la degenerazione dei neuroni dopaminergici costituenti la via nigro-striatale, causerà quindi una diminuzione dell'attività della via diretta ed un potenziamento della via indiretta [12]. Clinicamente questo si tradurrà nella comparsa di bradicinesia ed ipocinesia [13].

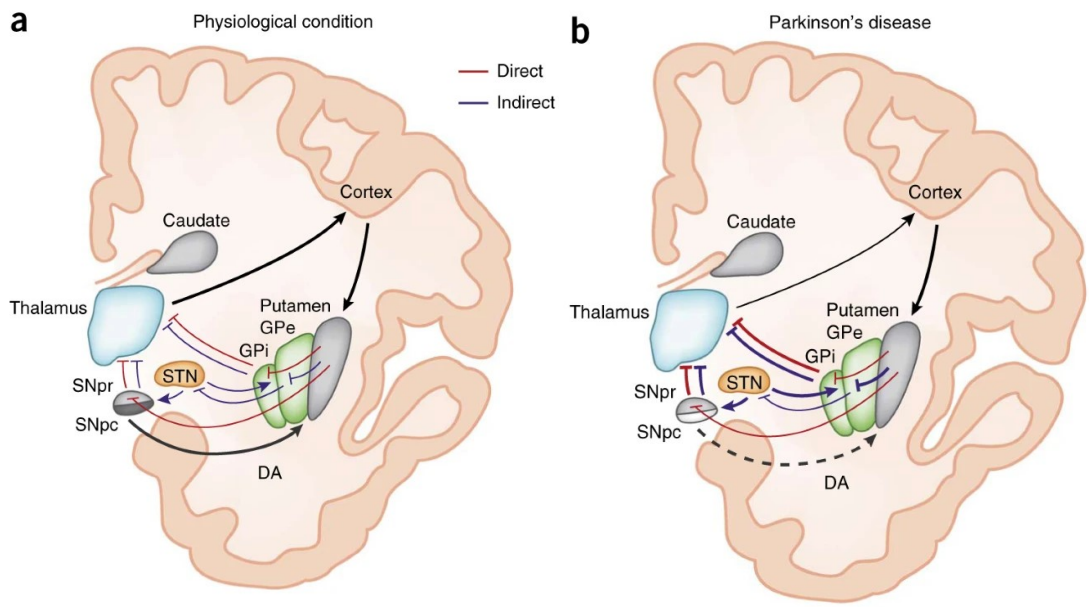


Figura 1. Rappresentazione schematica del modello classico della via diretta/indiretta nella condizione fisiologica e nella MP [9]

3.1.2.2 Il ruolo dell'attività oscillatoria dei nuclei della base

Numerosi studi hanno evidenziato come il meccanismo patologico alla base della MP sia più complesso di quel che si pensava: il modello classico del circuito motorio cortico-basale, dove si sosteneva che la diminuzione di dopamina portasse ad una eccessiva attività della via indiretta, non fornisce una spiegazione esaustiva dei meccanismi neurofisiologici che stanno alla base della MP [14] [15].

Essi, infatti, comprendono alterazioni della connettività funzionale e una sincronizzazione anomala dell'attività neurale, in particolare nella banda di frequenza beta (β, 13–30 Hz) a livello dei NdB. Questa iperattività β, osservata soprattutto nel STN e GPi, è correlata alla gravità della bradicinesia e della rigidità, e si riduce con farmaci dopaminergici o stimolazione cerebrale profonda (*Deep Brain Stimulation*, DBS). Infatti, le oscillazioni β patologiche, soprattutto quelle a bassa frequenza (13-20 Hz), sono considerate un segno distintivo della disfunzione motoria nella MP [14].

Oltre al ritmo β, le principali bande di frequenza che sono state associate a caratteristiche motorie nella MP sono theta (θ,4-7 Hz), gamma (γ, 30-90 Hz) e oscillazioni ad alta frequenza (*high-frequency oscillations*, HFO, 100-400 Hz). Le oscillazioni θ nello stato senza farmaci (OFF) sono state associate al tremore a riposo e sono osservabili nell'attività di singoli neuroni in aree chiave come il nucleo intermedio ventrale *(Ventral intermediate*, Vim) del talamo, il NST e il GPi; invece, dopo assunzione di farmaci dopaminergici (ON), l'attività a bassa frequenza nella banda θ può aumentare nel GPi e nel NST ed è stata associata alle discinesie indotte dalla levodopa.

Circa un terzo dei pazienti con MP mostra una stretta banda di attività γ "finemente sintonizzata" indotta dalla stimolazione nel NST e GPi; queste oscillazioni sono indotte da levodopa e sono state correlate alle discinesie da picco dose. In sintesi, la ricerca sulle oscillazioni cerebrali degli ultimi decenni ha fornito evidenze sul ruolo delle alterazioni delle oscillazioni neuronali nella fisiopatologia del MP, che è stata pertanto definita "oscillopatia" [14].

3.1.2.3 Il ruolo del cervelletto nel MP

Il cervelletto è un'importante struttura del sistema nervoso centrale, localizzata nella fossa cranica posteriore, caratterizzata dalla presenza di estese connessioni bidirezionali con la corteccia cerebrale, il tronco encefalico e il midollo spinale [16].

È tradizionalmente considerato una struttura deputata al controllo adattativo dei movimenti volontari in termini di coordinazione motoria, mantenimento dell'equilibrio, regolazione del tono muscolare, partecipando attivamente nell'apprendimento motorio e nella previsione sensori-motoria. In particolare, è coinvolto nella pianificazione, esecuzione e correzione dei movimenti basati sul feedback sensoriale ricevuto [17]. Inoltre, è ora noto che il cervelletto è coinvolto in vari processi linguistici, cognitivi, affettivi, sociali e comportamentali [18].

Sebbene gli studi neurofisiologici sulla MP si siano tradizionalmente concentrati sulla disfunzione dei NdB, i risultati degli ultimi dieci anni indicano un coinvolgimento cerebellare nella fisiopatologia e nella patogenesi della malattia.
Anche se il cervelletto non è incluso nello schema di stadiazione di Braak [7], studi degli ultimi due decenni hanno dimostrato la presenza nelle persone con MP di α-sinucleinopatia nella sostanza bianca cerebellare, localizzata principalmente negli assoni delle cellule di Purkinje come strutture granulari-filamentose. Inoltre, la neurodegenerazione e l'atrofia cerebellare sono ben documentate nella MP, tanto che le persone affette potrebbero essere differenziate dagli individui sani sulla base delle alterazioni della sostanza grigia nel cervelletto con una precisione superiore al 95%.
In aggiunta, anche se il cervelletto non è universalmente riconosciuto come parte del sistema dopaminergico, evidenze emergenti indicano la presenza di dopamina nel cervelletto, sebbene il suo ruolo nella patogenesi della MP non sia ancora stato ben studiato. Nel complesso, la proiezione neurale che collega il cervelletto con le regioni dopaminergiche che coinvolgono il mesencefalo, il talamo e la corteccia prefrontale indica che è probabile che il cervelletto abbia un ruolo importante nelle manifestazioni cliniche e nei meccanismi fisiopatologici del MP (Figura 2) [19].

Anche se il cervelletto e i NdB sono tradizionalmente considerati sistemi distinti che interagiscono principalmente a livello della corteccia cerebrale, molti studi anatomici hanno fornito prove di numerose connessioni tra le strutture, supportando ulteriormente il ruolo del cervelletto nella MP [20].

Studi recenti in primati non umani, avvalendosi di traccianti virali, hanno rivelato l'esistenza di percorsi sinaptici diretti tra il cervelletto e i NdB. In particolare, il nucleo dentato del cervelletto (uno stadio di output dell'elaborazione cerebellare) proietta disinapticamente, attraverso il talamo, allo striato (uno stadio di input dei NdB), inclusi il putamen sensomotorio e i neuroni del percorso "indiretto" che proiettano al GPe. Reciprocamente, dai NdB esiste una proiezione disinaptica reciproca dal NST alla corteccia cerebellare, con un relè nei nuclei pontini [21]. Queste connessioni dirette forniscono la base anatomica per l'integrazione delle funzioni cerebellari e dei NdB, e per la possibile propagazione di attività anomale tra le due strutture in condizioni patologiche come la MP.
Alcuni studi hanno dimostrato alterazioni della connettività intracerebellare nelle persone con MP, ma il livello di connettività dipende in larga misura dallo stadio della malattia e dalla risposta individuale alla levodopa.

Inoltre, è stato ipotizzato un ruolo compensatorio del cervelletto nella fisiopatologia del MP, che contribuisce a mitigare gli effetti della disfunzione dei NdB [22].
Infatti, evidenze recenti suggeriscono che, durante le fasi iniziali e moderate del MP, la connettività funzionale tra il putamen e cervelletto (in particolare il lobulo V) sia significativamente aumentata rispetto ai controlli sani. Questo meccanismo sarebbe correlato con una migliore performance motoria nei pazienti con MP. Ciò implica che il cervelletto viene maggiormente coinvolto per ottimizzare il controllo motorio quando i compiti diventano più difficili a causa della denervazione dopaminergica nel putamen. Tuttavia, con il progredire della malattia, i cambiamenti patologici nei circuiti cerebellari potrebbero in ultima analisi portare a una diminuzione della connettività funzionale [22].
Infatti, evidenze recenti suggeriscono che, durante le fasi iniziali e moderate del MP, la connettività funzionale tra il putamen e il cervelletto (in particolare il lobulo V) sia significativamente aumentata rispetto ai controlli sani. Questo meccanismo sarebbe correlato con una migliore performance motoria nei pazienti con MP. Ciò implica che il cervelletto viene maggiormente coinvolto per ottimizzare il controllo motorio quando i compiti diventano più difficili a causa della denervazione dopaminergica nel putamen. Tuttavia, con il progredire della malattia, i cambiamenti patologici nei circuiti cerebellari potrebbero in ultima analisi portare a una diminuzione della connettività funzionale [22].

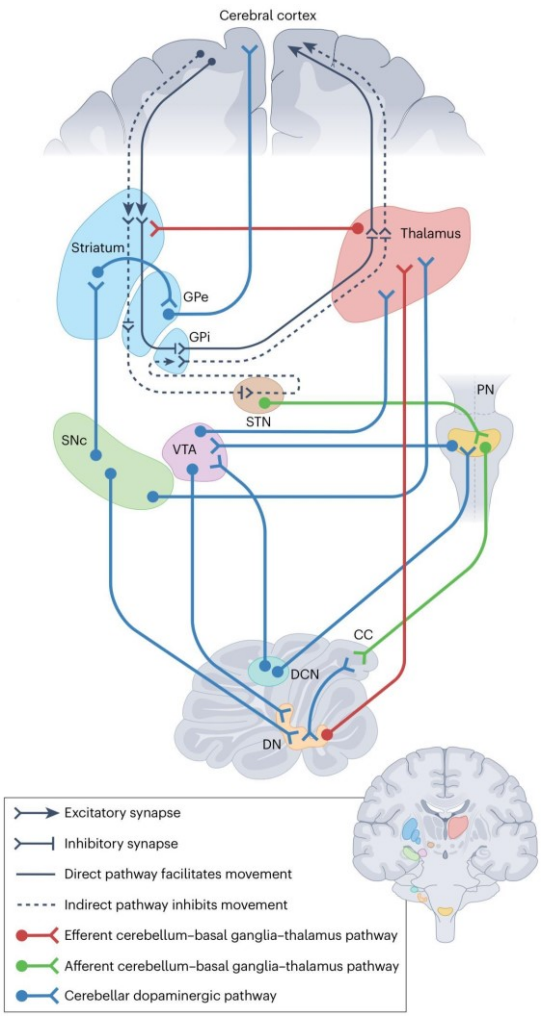


Figura 2: Circuiti cerebellari correlati alla MP [19]

3.1.2.4 Il contributo cerebellare ai sintomi motori

Studi funzionali e di connettività hanno rilevato che cambiamenti in aree specifiche del cervelletto sono associati a diversi sintomi clinici della MP. Ad esempio, utilizzando la tomografia ad emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET), uno studio ha dimostrato che un aumento anomalo dell'attività metabolica nei lobi cerebellari anteriori e nel verme è correlato alla gravità dei deficit motori, e un aumento dell'attività metabolica nella porzione posterolaterale destra del cervelletto è correlato al deficit delle funzioni cognitive. [4]

La fisiopatologia della bradicinesia e del tremore nella MP e nei parkinsonismi è complessa e riflette una disfunzione di una rete cerebrale estesa, che va oltre la classica deplezione dopaminergica [23]. La bradicinesia, caratterizzata da lentezza, ipocinesia e "effetto sequenza", è classicamente associata a una significativa deplezione dopaminergica striatale (stimata attorno al 50-60%).

Questa deplezione altera l'equilibrio delle vie dirette e indirette dei NdB, portando a un'eccessiva inibizione delle proiezioni motorie talamo-corticali [24].

A livello elettrofisiologico, si manifesta con un aumento dell'attività oscillatoria nella banda β (13-30 Hz), caratterizzata da burst di attività prolungati ed eccessiva sincronizzazione, correlata al deficit motorio e ridotta dalla levodopa e dalla DBS. Oltre ai gangli della base, contribuiscono anomalie intrinseche della corteccia motoria primaria (M1), come aumentata eccitabilità e ridotta plasticità, e un coinvolgimento del cervelletto, che mostra attivazione e connettività anomale e può compensare le disfunzioni dei NdB e della M1 [24]

Il tremore nel MP, invece, ha una fisiopatologia unica e distinta dagli altri sintomi motori, la cui gravità non correla con la sola deplezione dopaminergica striatale, ma coinvolge anche altri sistemi neurotrasmettitoriali come serotonina, noradrenalina e acetilcolina.
È il risultato di un'interazione tra i gangli della base e un circuito motorio cerebello-talamo-corticale [25]. L'ipotesi "dimmer-switch" propone che i NdB "inneschino" un episodio di tremore, mentre il circuito cerebello-talamo-corticale ne "moduli" l'ampiezza, spiegando l'efficacia degli interventi terapeutici mirati a entrambi i circuiti. Questa teoria si fonda sull'evidenza che le fluttuazioni nell'ampiezza del tremore sono associate all'attività di un circuito cerebello-talamo-corticale, mentre i cambiamenti del tremore legati alla sua insorgenza (ossia quando è al suo massimo) sembrano essere congiuntamente dipendenti dall'attività interna dei NdB [26].

3.1.3 - CARATTERISTICHE CLINICHE

La MP è caratterizzata da una combinazione di sintomi motori, con esordio asimmetrico e successiva diffusione controlaterale nelle fasi successive di malattia. Le tipiche manifestazioni motorie sono precedute, anche di molti anni o decenni, dai sintomi non motori (Figura 3) [2].

3.1.3.1 I sintomi motori

I criteri della *Movement Disorder Society* (MDS) definiscono la bradicinesia come lentezza del movimento accompagnata da una riduzione progressiva dell'ampiezza (ipocinesia) o della velocità durante l'esecuzione (effetto sequenza) e dall'impossibilità a cominciare il movimento (acinesia). Le manifestazioni bradicinetiche si esprimono in diverse aree del corpo: nel distretto cranico si osservano ipomimia, una diminuzione della frequenza di ammiccamento accompagnati a una voce ipofonica e monotona. Si verifica, inoltre, una riduzione degli atti spontanei della deglutizione con conseguente scialorrea e disfagia. La marcia è caratterizzata da passi di ampiezza ridotta, con festinazione, acinesia e blocchi motori (freezing della marcia) che solitamente si verificano all'inizio del movimento o nei cambi di direzione [24]

Il tremore si verifica in circa il 75% dei pazienti e si osserva classicamente a riposo a una frequenza di 4-6 Hz e colpisce tipicamente gli arti superiori, ma può verificarsi anche in altre aree del corpo, tra cui gli arti inferiori, il mento o la lingua.

Oltre al tremore a riposo, che è il più comune, sono state descritte altre due forme di tremore associate alla malattia, ossia il tremore posturale, che si manifesta durante il mantenimento di una postura e il tremore cinetico, che appare nell'esecuzione di movimenti volontari [25].

La rigidità consiste in una maggiore resistenza che si manifesta quando un segmento corporeo viene mosso passivamente (flessione, estensione o rotazione). Questo aumento del tono muscolare non è influenzato dalla velocità o dalla direzione del movimento applicato e può manifestarsi in diverse parti del corpo, inclusi gli arti, il collo e il tronco [2].

Altra manifestazione motoria rilevante in MP è l'instabilità posturale, che compare circa un decennio dopo la diagnosi iniziale ed è, insieme al fenomeno del freezing, la condizione maggiormente associata alle cadute nella MP.

3.1.3.2 I sintomi non motori

I sintomi non motori (*Non-Motor Symptoms*, NMS), che esordiscono nelle fasi precoci della malattia definendo lo stato "premotorio" della MP, sono conseguenza della degenerazione del sistema nervoso autonomo (SNA) e dal coinvolgimento della corteccia cerebrale e del tronco encefalico [26].Questi comprendono una vasta gamma di manifestazioni, tra cui iposmia/anosmia, stipsi/costipazione, disturbo comportamentale del sonno REM (*Rapid Eye Movement Sleep Behaviour Disorder*, RBD), accompagnati da deficit cognitivi, disturbi dell'umore e da disfunzione autonomica [2].

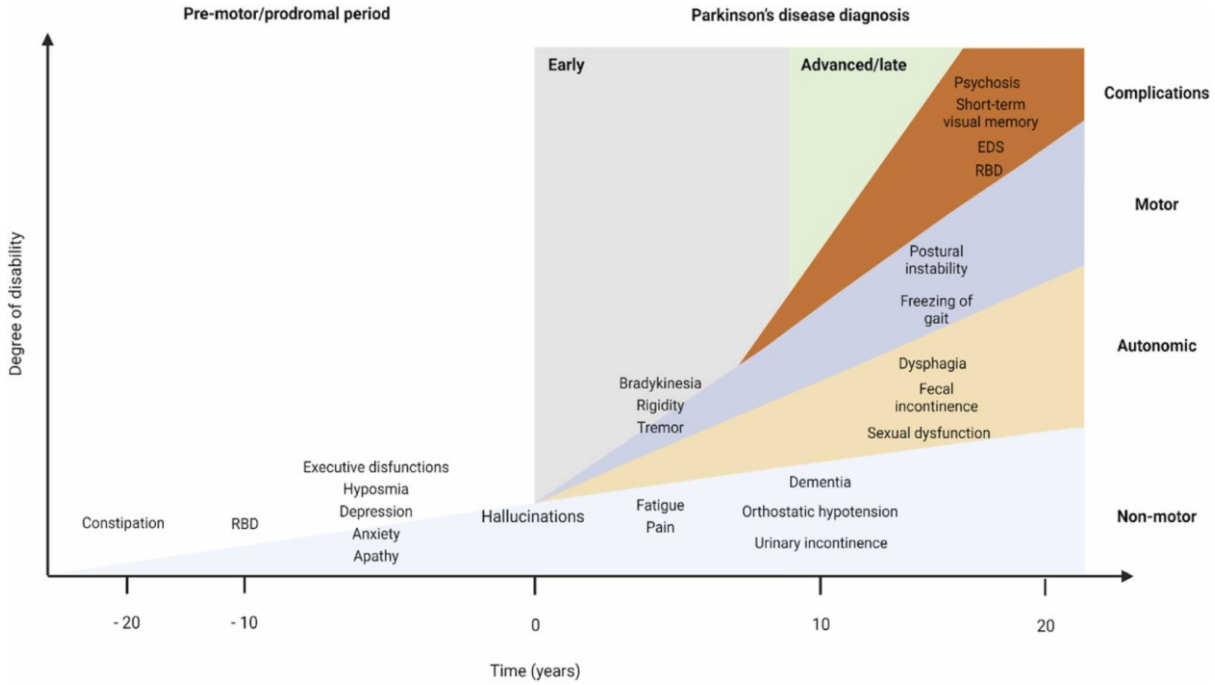


Figura 3: Esordio e progressione dei sintomi della MP [2]

3.1.4 - DIAGNOSI

Anche se sono stati recentemente validati criteri diagnostici clinici modificati, progettati per migliorare l'accuratezza diagnostica del MP, la diagnosi rimane una sfida poiché le caratteristiche cliniche della malattia si sovrappongono ad altre condizioni neurodegenerative e i test diagnostici o i biomarcatori non consentono ancora una diagnosi definitiva fin dalle fasi iniziali.

La diagnosi della MP è basata sulla combinazione di due approcci: l'osservazione clinica, che implica una rigorosa valutazione neurologica del paziente e la raccolta anamnestica, che permette di indagare la presenza e progressione dei sintomi motori e non motori [27].

Per migliorare l'accuratezza diagnostica di una diagnosi clinica del MP, la *Movement Disorder Society* (MDS) ha proposto una serie di criteri che rappresentano una versione rivista dei criteri Queen Square Brain Bank, i più comunemente utilizzati negli ultimi decenni (Figura 4) [28] [27].

Dopo la valutazione della presenza di parkinsonismo, la determinazione della MP si basa su tre categorie di caratteristiche diagnostiche: criteri di esclusione assoluta (che escludono la MP), segnali d'allarme (che devono essere controbilanciati da ulteriori criteri di supporto per consentire la diagnosi di MP) e criteri di supporto (caratteristiche positive che aumentano la fiducia nella diagnosi). Vengono delineati due livelli di certezza: MP clinicamente accertato e MP probabile [28]

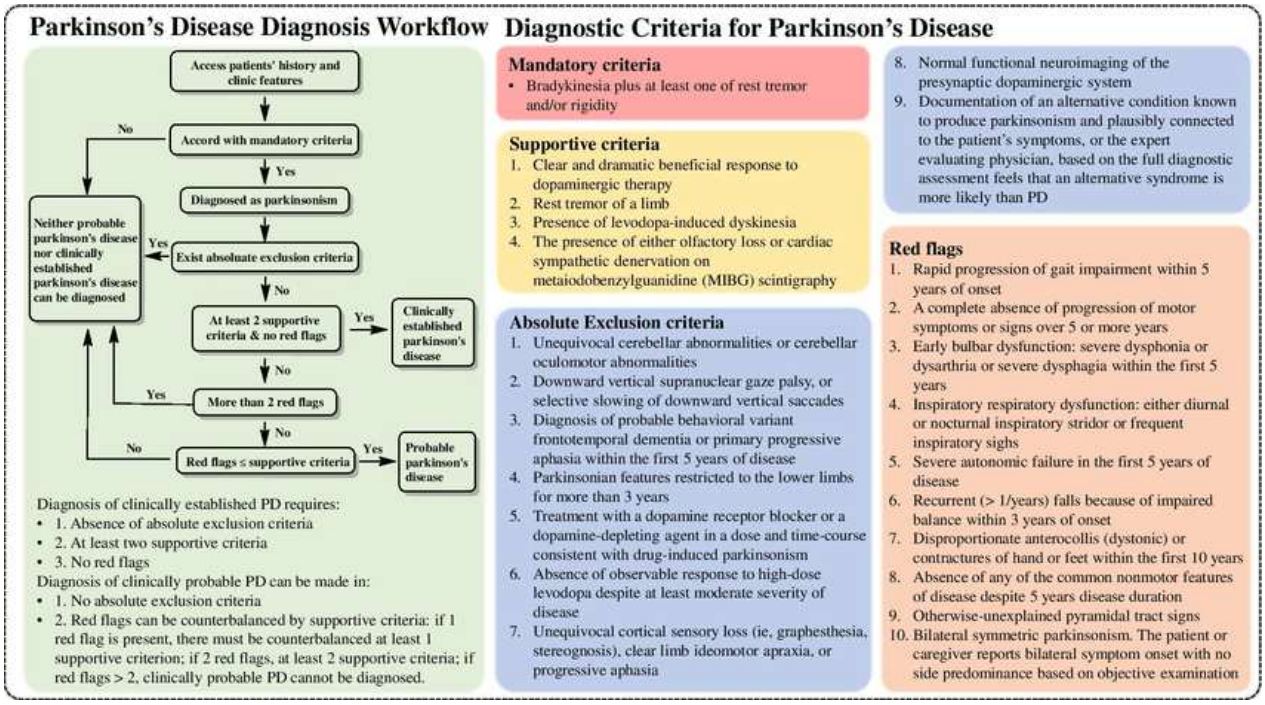


Figura 4: Flusso di lavoro per la diagnosi del MP e relativi criteri MDS [28]

3.1.5 - STADI DELLA MALATTIA

3.1.5.1 Lo stadio preclinico e prodromico

Il periodo in cui si presentano i NMS è stato concettualizzato come fase prodromica della MP. In questo contesto, si stima che fino all'80% delle cellule dopaminergiche nel sistema nigrostriatale vengano perse prima che inizino a comparire i sintomi motori caratteristici, che solitamente si manifestano 10-20 anni dopo (Figura 3) [2].

Inoltre, è in fase di definizione uno stadio ancora più precoce, definito "MP preclinica", in cui in assenza di segni e sintomi, solo l'analisi di specifici biomarcatori può predire l'insorgenza futura della malattia [29].

3.1.5.2 Lo stadio avanzato

Questo stadio è caratterizzato da un significativo peggioramento dei sintomi motori e non motori e dalla comparsa di complicanze legate alla terapia dopaminergica (fluttuazioni motorie e discinesie) [30]. In questa fase, la finestra terapeutica della L-Dopa si riduce progressivamente, portando a fluttuazioni motorie in cui i sintomi peggiorano quando la concentrazione plasmatica di dopamina è bassa e l'effetto del farmaco svanisce ("fase OFF"), prima della successiva assunzione ("fase ON"). Questi periodi "OFF", che possono includere sia sintomi motori che non motori, generalmente

appaiono alcuni anni dopo l'inizio della terapia dopaminergica e la loro prevalenza aumenta nel tempo (Figura 5) [5].

Un'altra complicanza comune sono le discinesie, movimenti involontari di tipo distonico o coreico del tronco e degli arti, che si manifestano tipicamente quando le concentrazioni di levodopa sono al picco o in fase di rapido aumento o riduzione. Si stima che circa il 40% degli individui con MP sviluppi discinesie dopo 4-6 anni di trattamento con levodopa [31].

Oltre alle complicanze motorie, lo stadio avanzato della MP è associato a un crescente carico di sintomi non motori, che spesso rispondono meno alle terapie dopaminergiche poiché le disfunzioni non sono più solo legate alle vie dopaminergiche. Questi includono deterioramento cognitivo (che può evolvere in demenza), apatia, allucinazioni, psicosi, disturbi del sonno, disfunzione autonomica (costipazione, ipotensione ortostatica e disfunzione urinaria), e problemi significativi del linguaggio (disartria) e della deglutizione (disfagia). Caratteristiche motorie avanzate non dopaminergiche includono anche problemi posturali, dell'equilibrio ed episodi di freezing della marcia ricorrenti. [5]

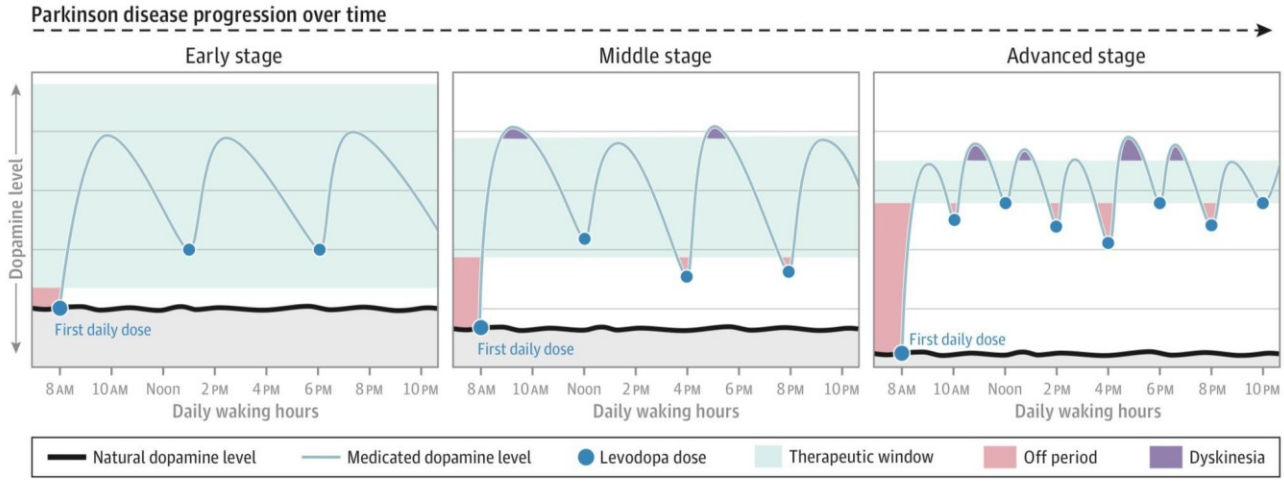


Figura 5: cambiamenti della finestra terapeutica dei farmaci dopaminergici con la progressione della MP [5]

3.1.6 - TERAPIA

Il trattamento della MP è sintomatico e multidisciplinare, non esistendo terapie specifiche in grado di arrestare o rallentare la progressione della malattia. [5]

3.1.6.1 Terapia levodopa e altri trattamenti farmacologici

Da quando è stata scoperta, la levodopa è considerata il *gold standard* nel trattamento della MP, anche se, con l'avanzamento della malattia, dopo 5 anni più del 50% dei pazienti manifestano instabilità nella risposta terapeutica e complicanze motorie. Ciò non è dovuto a tolleranza al farmaco o a una

perdita di efficacia della levodopa, ma piuttosto alla progressione della malattia e alla progressiva perdita della capacità di immagazzinare e rilasciare dopamina esogena ed endogena da parte dei neuroni dopaminergici rimanenti, associata ad assorbimento gastrointestinale irregolare e difficoltà nel trasporto attraverso la barriera emato-encefalica [5] [32].
In questi casi, può essere necessario aumentare il dosaggio di levodopa e/o associarla ad altri farmaci come inibitori catecol-O-metiltransferasi e gli inibitori delle monoammino-ossidasi B, che bloccano gli enzimi che degradano la dopamina prolungando gli effetti della levodopa o i farmaci dopamino-agonisti che agiscono tramite stimolazione diretta dei recettori dopaminergici a livello striatale [5]

3.1.6.2 I trattamenti per la fase avanzata della MP avanzata

Si ricorre a terapie avanzate nel momento in cui le terapie farmacologiche, sebbene ottimizzate, non sono più sufficienti a controllare adeguatamente i sintomi con significativo peggioramento della qualità di vita dei pazienti. Infatti, questi trattamenti sono basati sulla somministrazione terapeutica continua e stabile, aumentando il tempo trascorso nello stato clinico ON, riducendo le fluttuazioni motorie e le discinesie.
Tra quelle disponibili, sono presenti l'infusione continua intestinale di levodopa-carbidopa, l'infusione sottocutanea continua di apomorfina o levodopa e la stimolazione cerebrale profonda [5] [33].

3.1.6.3 Tecniche di stimolazione cerebrale non invasiva (NIBS)

Le tecniche di stimolazione cerebrale non invasiva (*Non-invasive Brain Stimulation*, NIBS) comprendono diverse metodologie di modulazione dell'attività corticale, e offrono nuove prospettive nella comprensione della fisiopatologia cerebrale e nello sviluppo di interventi terapeutici mirati. Le metodologie più diffuse comprendono la stimolazione magnetica transcranica (*Transcranial Magnetic Stimulation*, TMS) e la stimolazione elettrica transcranica, che include la stimolazione transcranica a corrente continua (*transcranial Direct Current Stimulation*, tDCS) e la stimolazione transcranica a corrente alternata (*transcranial Alternating Current Stimulation*, tACS).

La TMS è una tecnica che, tramite brevi impulsi magnetici applicati al cuoio capelluto, genera una corrente elettrica nelle aree cerebrali sottostanti, inducendo la depolarizzazione neuronale. Viene utilizzata per esplorare l'eccitabilità corticale e valutare specifici circuiti intracorticali.

3.2 - tACS

3.2.1 - DEFINIZIONE E MECCANISMO D'AZIONE

La tACS è una tecnica di neuromodulazione non invasiva che agisce attraverso l'applicazione di una corrente elettrica sinusoidale a bassa intensità (generalmente inferiore a 2 mA) erogata tramite elettrodi applicati sullo scalpo [34].
A differenza della stimolazione transcranica a corrente diretta tDCS, che prevede l'applicazione di una corrente diretta che fluisce da un catodo ad un anodo attraverso lo scalpo, la tACS impiega una corrente alternata che cambia direzione ogni mezzo ciclo [35].

Il suo meccanismo principale si basa sul "principio del trascinamento" *(entrainment),* ovvero la capacità di sincronizzare l'attività di scarica di specifiche popolazioni neuronali alla frequenza della stimolazione esterna nell'area stimolata, sfruttando le proprietà oscillatorie intrinseche della regione cerebrale target [36].
L'efficacia della tACS è maggiore quando la frequenza di stimolazione corrisponde o si avvicina alla frequenza naturale ("risonanza endogena") dell'area cerebrale bersaglio o allo stato cerebrale esaminato (veglia vs sonno, riposo vs contrazione, ecc.). Generalmente, gli effetti della tACS sono limitati al periodo della stimolazione (*online*), sebbene alcuni studi suggeriscano che possa indurre modificazioni plastiche durature o effetti post-stimolazione in determinate condizioni o se combinata con altre tecniche.

3.2.2 - COMPONENTI DELLA tACS E TARGET DELLA STIMOLAZIONE

I componenti fondamentali della tACS includono un dispositivo stimolatore, che genera la corrente elettrica, collegato a due elettrodi di gomma conduttiva e di dimensioni 5x5 cm, che veicolano la corrente. Questi elettrodi sono racchiusi in spugne imbevute di soluzione salina per facilitare la conduzione della corrente, mantenendo le impedenze degli elettrodi al di sotto di 10 kΩ (Figura 6) [37].
La corrente elettrica è alternata, sinusoidale e a bassa intensità, con un periodo di rampa di salita e discesa (generalmente di 3 secondi) per aumentare o diminuire progressivamente l'intensità della stimolazione all'inizio e alla fine.

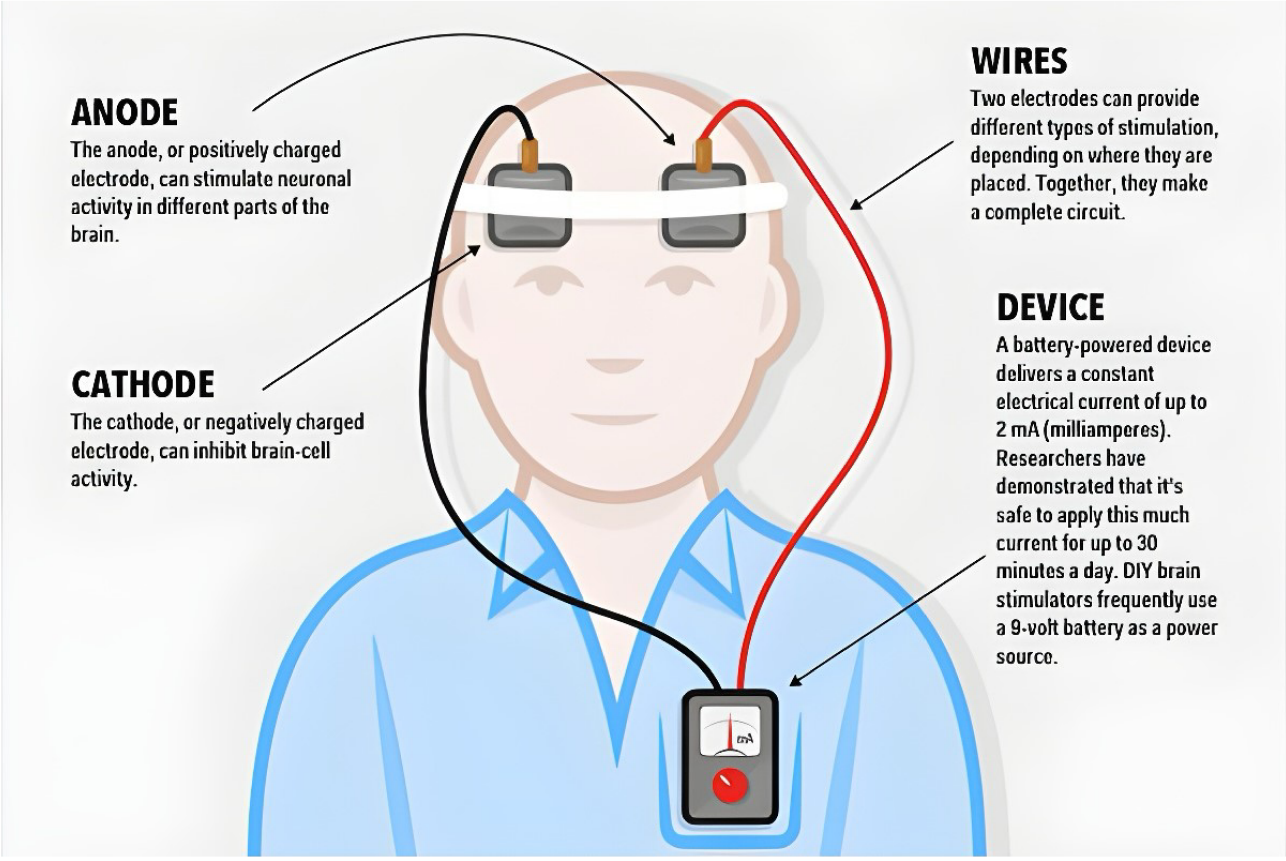


Figura 6: componenti della tACS/tDCS [38]

I principali target della tACS riflettono la diversità delle oscillazioni cerebrali, responsabili di processi cognitivi, motori e sensoriali. Gli elettrodi possono essere posizionati su diverse aree corticali a seconda della funzione che si intende modulare: per funzioni cognitive (come la memoria di lavoro o la velocità di elaborazione delle informazioni), la stimolazione può essere applicata sulla corteccia prefrontale dorsolaterale e sul precuneo; per l'elaborazione sensoriale, gli elettrodi si applicano sulla corteccia somatosensoriale, solitamente con frequenza mu (μ); infine per modulare l'ampiezza e la velocità del movimento, si posizionano sulla M1 o sul cervelletto.

Finora la gran parte degli studi sugli effetti della tACS nella MP hanno valutato l'effetto della stimolazione applicata su M1. Alcuni studi hanno osservato come la frequenza di stimolazione in banda β (13-30 Hz) peggiori la velocità del movimento nei pazienti con MP. Queste evidenze sono in linea con l'ipotesi che queste oscillazioni anomale abbiano un effetto "anti-cinetico" e un'eccessiva sincronizzazione β è un marcatore fisiopatologico riconosciuto nella MP, associato alla gravità della bradicinesia [39].

Al contrario, stimolare alla frequenza γ (30-100 Hz) migliora l'ampiezza del movimento nei pazienti con MP, con un ipotetico effetto "pro-cinetico". La tACS sulla M1 è stata utilizzata anche per

modulare forza, velocità e ampiezza dei movimenti della mano e per sopprimere il tremore a riposo, applicando la stimolazione alla frequenza individuale del tremore [40].

L'interesse per la tACS è cresciuto significativamente negli ultimi anni, sia in ambito clinico sia sperimentale. Le applicazioni attuali includono il trattamento di disturbi neurologici come la MP, la depressione e l'epilessia, oltre a un uso promettente per il miglioramento cognitivo e la modulazione dello stato di attenzione.

3.2.3 - tACS CEREBELLARE

Gli studi sulla tACS si sono principalmente concentrati sugli effetti della stimolazione sulla corteccia cerebrale, mentre sono ancora poche le ricerche che indagano gli effetti della stimolazione applicata al cervelletto. In realtà la tACS cerebellare rappresenta una promettente tecnica di neuromodulazione, che permette di modulare in maniera non invasiva l'attività oscillatoria intrinseca del cervelletto e potenzialmente le sue connessioni con altre regioni cerebrali come M1 o i NdB [36].

I principali bersagli cellulari sono le cellule granulari, caratterizzate da oscillazioni intrinseche in banda θ, e le cellule di Purkinje, che mostrano oscillazioni γ. Le attività oscillatorie a tali frequenze hanno un ruolo chiave nella modulazione dell'eccitabilità cerebellare e nella sincronizzazione delle reti neuronali. Ed è proprio per questo che l'applicazione della tACS in alcune patologie, tra cui la MP, potrebbe essere impiegata per ripristinare una corretta attività neurale, che a sua volta potrebbe tradursi in un beneficio terapeutico per i pazienti.
Finora, oltre alla MP, la tACS cerebellare è stata studiata principalmente nell'atassia cerebellare, nel tremore essenziale (TE) e nel tremore distonico. Inoltre, recenti studi hanno definito un legame tra l'attività oscillatoria del cervelletto e funzioni come i processi decisionali e l'elaborazione di stimoli emotivi, aprono nuove prospettive per lo studio del ruolo delle oscillazioni cerebellari nelle funzioni superiori [41].

In realtà, anche se è stato dimostrato che il trascinamento delle oscillazioni corticali attraverso la tACS possa indurre effetti benefici sui sintomi motori della MP, solo pochi studi hanno testato la tACS cerebellare nei disturbi del movimento. Inoltre, nessuno degli studi precedenti ha effettuato una valutazione completa degli effetti della tACS cerebellare: sono focalizzati sugli effetti sul tremore (escludendo altri sintomi come bradicinesia o distonia), applicando la tACS solo alla frequenza specifica del tremore di ciascun paziente, senza indagare le frequenze risonanti con l'attività cerebellare e altri possibili cambiamenti clinici [42].

Per esempio, in uno studio sono stati riportati alcuni effetti sul trascinamento delle fasi del tremore nel MP e nel TE, escludendo altri sintomi, mentre in un altro studio hanno valutato solo gli effetti sul tremore posturale e sul tremore distonico, senza valutare l'effetto sulla postura o sui movimenti distonici [42].

In soggetti sani, la tACS cerebellare è stata esplorata a diverse frequenze, tra cui la banda θ che ha avuto un effetto negativo sulla regolarità del movimento durante il tapping ritmico delle dita e ha aumentato la durata del movimento in un compito di puntamento oltre a modulare l'ampiezza del tremore nei pazienti con tremore essenziale. Invece per quanto riguarda la banda γ, alcuni studi non hanno evidenziato effetti significativi, mentre altri hanno registrato un miglioramento dell'accelerazione dei movimenti volontari durante un compito di apprendimento rapido [42]. In sintesi, le evidenze sugli effetti della tACS cerebellare θ e γ nell'uomo sono attualmente limitate e in parte contrastanti.

Anche se alcuni studi in letteratura hanno mostrato il potenziale della tACS cerebellare come strumento terapeutico nel trattamento di disturbi motori e cognitivi, le conoscenze attuali sono limitate sui suoi esatti meccanismi d'azione e sulla sua applicabilità. Infatti presenta una serie di limiti, che includono l'assenza di effetti consistenti a lungo termine (solo effetti transitori, prevalentemente *online*), la difficoltà ad ottenere misure neurofisiologiche dirette (EEG, fMRI, MEG) durante la stimolazione a causa degli artefatti e infine la variazione degli effetti della tACS in base allo stato funzionale del cervello al momento della stimolazione [35] [41].

4 - OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo principale di questo studio è stato verificare i possibili effetti della tACS cerebellare applicata alle frequenze θ e β in pazienti con MP. In particolare, si è indagato se la tACS determini effetti benefici, valutati clinicamente e oggettivamente, sulla bradicinesia esaminata nel movimento di finger tapping.

5 - MATERIALI E METODI

5.1 - PARTECIPANTI

Lo studio è stato condotto presso l'Unità Operativa Complessa (U.O.C.) di Neurologia dell'Azienda Ospedale di Padova. Sono stati arruolati 17 pazienti affetti da MP, la cui diagnosi è stata basata sugli attuali criteri clinici internazionali [27].

Sono stati considerati come criteri di esclusione la presenza di gravi comorbidità cognitive e psichiatriche valutate anamnesticamente e attraverso la somministrazione di scale cliniche standardizzate: la Beck Depression Inventory-II (BDI-Il), la Montreal Cognitive Assessment (MoCA) e la Frontal Assessment Battery (FAB). Altri criteri di esclusione includono un punteggio alla scala Hoehn&Yahr (H&Y) >3 e la presenza di discinesie indotte da levodopa, assunzione di farmaci che possano modificare l'eccitabilità o la plasticità cerebrale e controindicazioni alla tACS secondo le attuali linee guida internazionali. Infatti, anche se è noto che la tACS presenti un rischio "molto basso" di provocare crisi epilettiche anche in presenza di fattori in grado di abbassare la soglia per lo sviluppo di crisi, sono state escluse donne in gravidanza, soggetti affetti da epilessia, o portatori di sistemi di stimolazione vagale, o impiantati a livello intracranico (es., DBS), spinale e soggetti portatori di pacemaker cardiaco.

Al solo scopo di comparare le caratteristiche del movimento di finger tapping dei pazienti rispetto alla norma, sono stati inoltre reclutati 20 soggetti sani di controllo (*healthy controls*, HC) di sesso (13 maschi, 7 femmine) ed età (68.7±9.8 anni) comparabile ai pazienti con MP. In questi soggetti sono stati considerati i seguenti criteri di esclusione: la presenza di patologie neurologiche o psichiatriche maggiori e le possibili condizioni mediche che avrebbero potuto interferire con l'esecuzione dei compiti motori previsti dal protocollo sperimentale.

Tutti i soggetti hanno fornito il proprio consenso informato scritto a partecipare allo studio. Le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato di revisione istituzionale locale e gli esperimenti sono conformi alle norme della Dichiarazione di Helsinki.

ID	Età	Sesso	Durata malattia	Lato di prevalenza	MDS-UPDRS–III	MoCA	LEDD
PD1	66	M	4	SX	22	29	580
PD2	84	M	9	SX	38	16	625
PD3	63	M	4	SX	21	27	310
PD4	76	M	10	DX	32	24	720
PD5	63	F	5	DX	9	29	310
PD6	61	M	5	SX	19	22	605
PD7	80	F	3	DX	7	26	300
PD8	65	M	8	DX	20	30	400
PD9	81	M	5	DX	19	26	300
PD10	57	M	8	SX	7	28	735
PD11	46	M	6	DX	23	30	210
PD12	65	M	3	SX	12	23	100
PD13	79	M	5	DX	35	24	450
PD14	67	M	5	SX	34	13	560
PD15	76	M	6	SX	34	21	400
PD16	77	M	6	SX	43	23	510
PD17	73	M	3	SX	10	25	200
Media	69.3	-	5.58	-	22.6	22.4	430.2
DS	10	-	2.03	-	11.5	4.6	182.5

Tabella 1. Caratteristiche clinico-demografiche dei partecipanti.

5.2 - tACS

La tACS è stata erogata tramite uno stimolatore DC-Stimulator plus (neuroConn GmbH, Germania), utilizzando due elettrodi dedicati di dimensioni 5x5 cm, posizionati all'interno di spugne imbevute di soluzione salina.

Un elettrodo stimolante è stato posizionato sullo scalpo a livello della proiezione dell'emisfero cerebellare (1-2 cm al di sotto e 3-4 cm lateralmente all'inion) ipsilaterale all'emisoma più affetto, mentre il secondo elettrodo è stato posizionato sopra il muscolo buccinatore omolaterale, come in studi precedenti [41].

Gli elettrodi sono stati fissati tramite delle bande elastici intorno alla testa. Il montaggio è stato ottimizzato in modo da mantenere l'impedenza al di sotto dei 10 kΩ. Sono state utilizzate due diverse frequenze di stimolazione, che corrispondono alle principali frequenze di risonanza cerebellare, ossia 5Hz (θ-tACS) e 20Hz (β-tACS). In tutte le condizioni di stimolazione i periodi di ramp-up e rampi-down duravano 3 secondi e l'intensità di stimolazione elettrica da picco a picco è stata settata ad 1,5 mA [43] (Spampinato D, Brain Stimul. 2021). È stata inoltre eseguita una stimolazione tACS placebo (sham) a 5Hz, utilizzata come controllo, che consisteva in periodi di ramp-up e ramp-down ed 1 secondo di stimolazione (totale 7 secondi).

Lo studio è stato condotto in doppio cieco, né i partecipanti né gli sperimentatori che eseguivano la valutazione cinematica erano a conoscenza delle frequenze di stimolazione, che venivano impostate da un terzo sperimentatore.

5.3 - VALUTAZIONE CINEMATICA

Le registrazioni cinematiche sono state eseguite con un sistema di cattura del movimento (*motion capture*) optoelettronico (SMART motion system, BTS Engineering, Italia), costituito da tre telecamere a infrarossi che registravano lo spostamento 3D di marcatori (*markers*) riflettenti. I marker sono stati fissati con nastro adesivo al dito indice, al pollice e alla mano del partecipante, sempre dal lato in cui erano più evidenti i sintomi motori.

Utilizzando un software dedicato (SMART Analyzer, BTS Engineering, Italia) è stata eseguita un'analisi cinematica di vari parametri del movimento, in grado di descrivere complessivamente le diverse caratteristiche cliniche della bradicinesia.
Questi comprendono: (1) il numero totale di movimenti eseguiti; (2) il ritmo del movimento; (3) l'ampiezza angolare del movimento (espressa in gradi, °); (4) la velocità angolare del movimento (espressa in °/sec); (5) il decremento dell'ampiezza durante la ripetizione del movimento di 15 secondi; (6) il decremento della velocità durante la ripetizione del movimento di 15 secondi.

Ad eccezione del ritmo del movimento, misurato come il coefficiente di variazione (CV) degli intervalli tra i singoli movimenti di tapping, tutti i parametri sono stati determinati con tecniche di regressione lineare.

5.4 - DISEGNO SPERIMENTALE

I pazienti affetti da MP sono stati sottoposti ad una singola sessione sperimentale, in due condizioni farmacologiche: 1) >12 ore dall'ultima assunzione della terapia dopaminergica (stato OFF); 2) dopo

1 ora dall'assunzione della dose abituale di levodopa (stato ON). All'inizio della sessione, a tutti i pazienti venivano somministrati questionari per la valutazione clinica con scale di valutazione standardizzate specifiche per il MP. In particolare, la gravità dei sintomi motori è stata valutata sia in stato clinico OFF che ON attraverso la sezione III della "Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale" (MDS-UPDRS III), mentre il MoCA è stato somministrato per testare le funzioni cognitive, e la BDI-II per la presenza e gravità di sintomi depressivi. In ciascuna condizione clinica (OFF e ON) sono state eseguite registrazioni cinematiche di movimenti ripetuti delle dita della mano più affetta (*finger tapping*) durante la stimolazione tACS. La tACS cerebellare è stata erogata sull'emisfero cerebellare omolaterale all'emisoma più affetto a varie frequenze di stimolazione in ordine randomizzato: θ-tACS, β-tACS, e *sham*-tACS.

Il compito motorio consisteva in dodici serie totali, suddivise in tre blocchi, ciascuno composto da una serie di tapping (durata 15 secondi) per ogni condizione di stimolazione, con intervalli di riposo tra le serie (3 minuti) e i blocchi (5 minuti) per evitare l'affaticamento. Durante il task i partecipanti venivano continuamente incoraggiati al fine di eseguire il movimento in maniera più ampia e veloce possibile (Figura 7). Al termine di ogni condizione di stimolazione, ai pazienti è stato richiesto di riportare eventuali sensazioni visive o cutanee (ad es. parestesie urenti, puntorie o ipoestesia) indotte dalla stimolazione tACS valutate tramite una scala Visivo-Analogica (*Visual Analogue Scale,* VAS) da 0 (assenza di sensazione) a 10 (massima intensità, intollerabile).

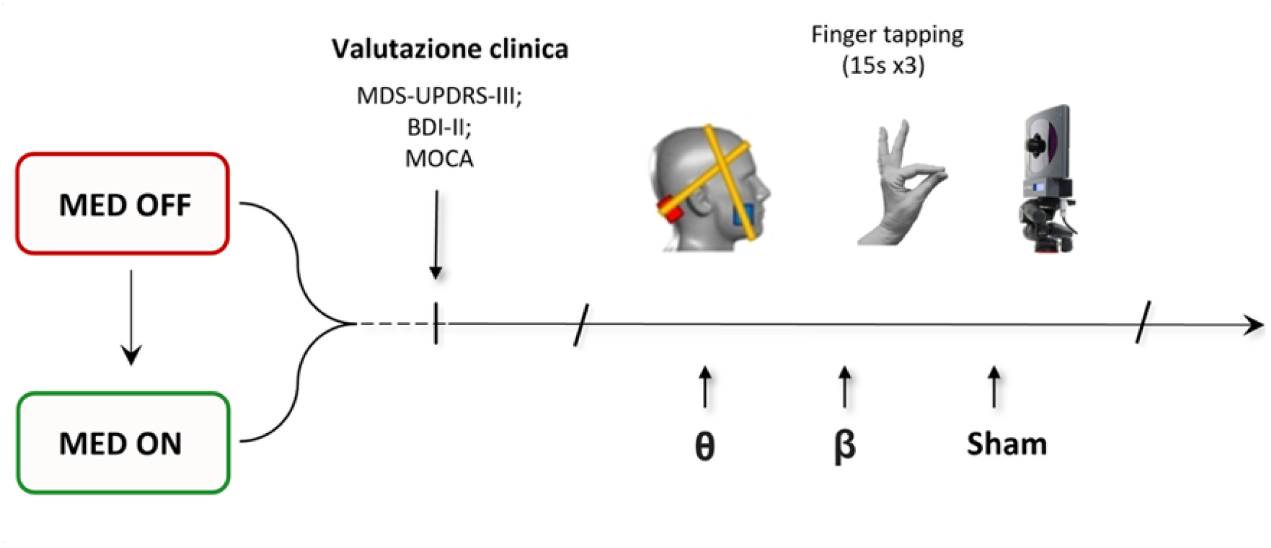


Figura 7: Protocollo sperimentale dello studio

5.5 - ANALISI STATISTICA

Misure statistiche descrittive (media e deviazione standard, DS) sono state utilizzate per la valutazione delle variabili clinico-demografiche e cinematiche. La normalità dei dati è stata verificata con il test di Kolmogorov–Smirnov.

Al fine di valutare la presenza di differenze significative nelle caratteristiche del movimento in condizione basale (condizione sham-tACS) tra il gruppo di pazienti MP valutati in condizione di OFF farmacologico e il gruppo di soggetti sani, è stato utilizzato un t-test per campioni indipendenti (*unpaired t-test*). L'analisi è stata condotta considerando, per ciascun partecipante, i seguenti parametri cinematici: numero di movimenti, velocità, ritmo, ampiezza, effetto sequenza (in termini di decremento di ampiezza e velocità per movimenti ripetuti).

Al fine di valutare possibili effetti della stimolazione tACS alle diverse frequenze di stimolazione (θ- e β-tACS) nei pazienti PD sono state eseguite ANOVA a misure ripetute (rmANOVA) separate per ciascun parametro cinematico considerato (numero di movimenti, velocità, ritmo, ampiezza ed effetto sequenza). Per l'analisi sono stati considerati il fattore "frequenza" (tre livelli: θ, β e sham) e "stato" (due livelli: OFF e ON). Le analisi post hoc sono state condotte applicando il test di correzione di Duncan.

Al fine di valutare le correlazioni tra parametri cinematici analizzati e variabili cliniche e demografiche dei pazienti (punteggio alla scala MDS-UPDRS III) è stato utilizzato il test di correlazione di Spearman. Il livello di significatività è stato fissato a $\alpha = 0{,}05$.

6 - RISULTATI

6.1 - DIFFERENZE TRA HC E PAZIENTI CON MP

L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative tra il gruppo di pazienti MP valutati in OFF farmacologico e HC per diversi parametri cinematici rilevati in condizioni basali (durante sham-tACS). In particolare, il numero medio di movimenti eseguiti è risultato significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli (media MP= 40.9; HC=55.09; p = 0.005). L'analisi ha inoltre rilevato una riduzione significativa dell'ampiezza del movimento nei pazienti (media: MP= 46.8°; HC= 53.5; p = 0.03), così come della velocità (media: MP= 848.4; HC=1025.8; p = 0.02).

Inoltre, il CV, indicativo della variabilità tra i movimenti (ritmo), è risultato maggiore nei pazienti rispetto ai soggetti sani (media: MP=0.11; HC= 0.08; p = 0.04), suggerendo un'alterazione del ritmo nei pazienti MP. Sono state peraltro riscontrate differenze significative nel decremento dell'ampiezza angolare per movimenti ripetuti tra i due gruppi, con valori mediamente più bassi nei pazienti (media: MP=-0.40; HC=-0.14; p = 0.001), suggerendo la presenza specifica del cosiddetto "effetto sequenza" sull'ampiezza dei movimenti nei pazienti MP.

Al contrario, per quanto riguarda il decremento dell'ampiezza angolare, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi (media: MP=6.42; HC=4.81; p = 0.22), suggerendo che questo specifico parametro motorio non sia influenzato in modo marcato dalla patologia nella condizione considerata (Figura 8).

6.2 - ANALISI EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE tACS E DEL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

L'analisi dei possibili effetti tACS alle diverse frequenze di stimolazione e dello stato farmacologico (OFF e ON levodopa) sul numero di movimenti eseguiti durante finger tapping nei pazienti MP ha evidenziato un effetto significativo del fattore "stato" ($F_{1,16}$=12.99, p=0.002), mentre non sono stati riscontrati effetti significativi del fattore "frequenza" ($F_{2,32}$=1.38, p=0.26) né interazioni "stato x frequenza" ($F_{2,32}$=1.05, p=0.36). Ciò indica un miglioramento significativo del numero di movimenti con l'assunzione di levodopa, senza un effetto significativo della tACS applicata alle frequenze di stimolazione testate su questo parametro cinematico.

La rmANOVA eseguita per l'analisi degli effetti della tACS e dello stato farmacologico sull'ampiezza angolare del movimento ha mostrato un effetto significativo del fattore "stato"

($F_{1,16}$=4.71, p=0.04), indicando che l'assunzione di levodopa determina un miglioramento di questo parametro rispetto alla condizione OFF. Al contrario, il fattore "frequenza" non ha mostrato un effetto significativo ($F_{2,32}$=1.11, p=0.34), suggerendo che le diverse frequenze di tACS non influenzano in modo rilevante l'ampiezza del movimento. Infine, non è stata riscontrata alcuna interazione significativa "stato x frequenza" ($F_{2,32}$=0.16, p=0.85), evidenziando che l'effetto positivo della levodopa è indipendente dalla frequenza di stimolazione (Figura 8).

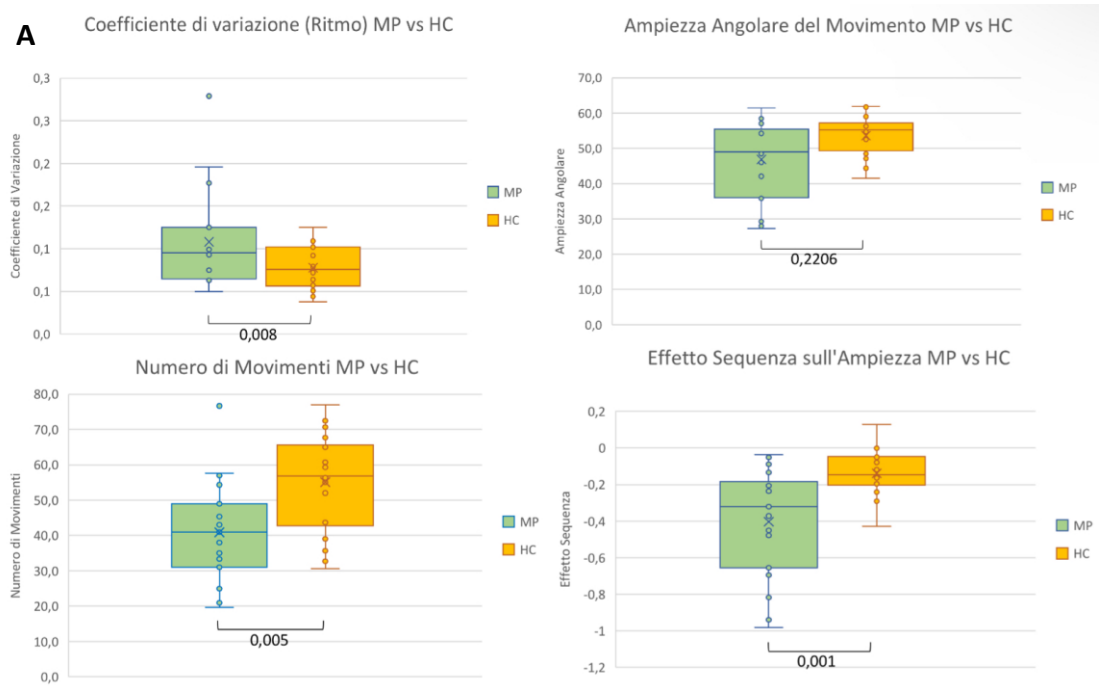
Risultati simili sono stati ottenuti dall'analisi degli effetti della tACS e della levodopa sulla velocità angolare del movimento. È infatti stato riscontrato un effetto significativo del fattore "stato" ($F_{1,16}$=6.31, p=0.02), suggerendo un aumento significativo di tale parametro indotto dalla levodopa nello stato ON rispetto alla condizione OFF. Al contrario, il fattore "frequenza" non ha mostrato un effetto significativo ($F_{2,32}$=0.54, p=0.59), ad indicare che la stimolazione tACS alle diverse frequenze di stimolazione testate non modula significativamente questo parametro. Infine, non è stata osservata un'interazione significativa "stato x frequenza" ($F_{2,32}$=0.62, p=0.54), a suggerire come l'effetto della levodopa sulla velocità angolare sia indipendente dalla stimolazione tACS.

La valutazione di tali effetti sul CV nei pazienti MP non ha evidenziato un effetto significativo del fattore "stato" ($F_{1,16}$=0.03, p=0.86), indicando che l'assunzione di levodopa non ha determinato variazioni rilevanti nel CV (ritmo) dei movimenti. Al contrario, è stato riscontrato un effetto principale significativo del fattore "frequenza" ($F_{2,32}$=3.44, p=0.04), suggerendo che la stimolazione tACS influenzi in modo significativo la variabilità del movimento. L'analisi post-hoc ha permesso di approfondire tale effetto, dimostrando un aumento significativo del CV tra la θ-tACS e sham-tACS (p=0.02) e tra θ-tACS e β-tACS (p=0.05), mentre non sono state riscontrate differenze tra β- e sham-tACS (p=0.67). Questo indica un effetto specifico della tACS alla frequenza θ nel peggioramento del ritmo del movimento rispetto alla condizione di controllo (sham-tACS). Non è stata osservata alcuna interazione significativa "stato x frequenza" ($F_{2,32}$=0.64, p=0.53) indicando che l'effetto della stimolazione tACS sulla variabilità dei movimenti è indipendente dall'assunzione di levodopa (Figura 8).

L'analisi degli effetti della tACS sul decremento dell'ampiezza angolare dei movimenti (effetto sequenza) ha mostrato che non vi è un effetto significativo del fattore "stato" ($F_{1,16}$=3.32, p=0.08), indicando che l'assunzione di levodopa non ha migliorato questo aspetto della bradicinesia. Tuttavia, l'analisi ha evidenziato un'interazione significativa tra i fattori "stato" e "frequenza" ($F_{2,32}$=3.44, p=0.04), indicando un effetto della tACS sul decremento dell'ampiezza a seconda della condizione

farmacologica. In altre parole, la modulazione della stimolazione a diverse frequenze influenza l'andamento dell'ampiezza dei movimenti in modo differente a seconda che i pazienti si trovino in condizione ON o OFF levodopa. L'analisi post-hoc condotta per indagare tale interazione significativa ha evidenziato valori ridotti di decremento di ampiezza (ovvero un miglioramento dell'effetto sequenza) durante θ-tACS rispetto a sham-tACS ($p=0.03$) e β-tACS ($p=0.04$) in condizione OFF, mentre non sono state riscontrate differenze tra β-tACS e sham-tACS ($p=0.87$), mentre non sono state osservate differenze significative tra la θ-tACS, β-tACS e sham-tACS in condizione ON ($p>0.05$ per tutti i confronti) (Figura 8). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che l'effetto della θ-tACS sulla modulazione dell'effetto sequenza è più evidente in assenza di levodopa.

Infine, la rmANOVA eseguita per valutare gli effetti della tACS e della levodopa sul decremento della velocità angolare, non ha mostrato effetti significativi del fattore "stato" ($F_{1,16}=0.30$, $p=0.59$), "frequenza" ($F_{2,32}=0.01$, $p=0.99$), né un'interazione significativa "stato x frequenza" ($F_{2,32}=3.44$, $p=0.04$). Ciò indica l'assenza di modulazione di questo parametro cinematico da parte della levodopa e della tACS o dalla loro combinazione.



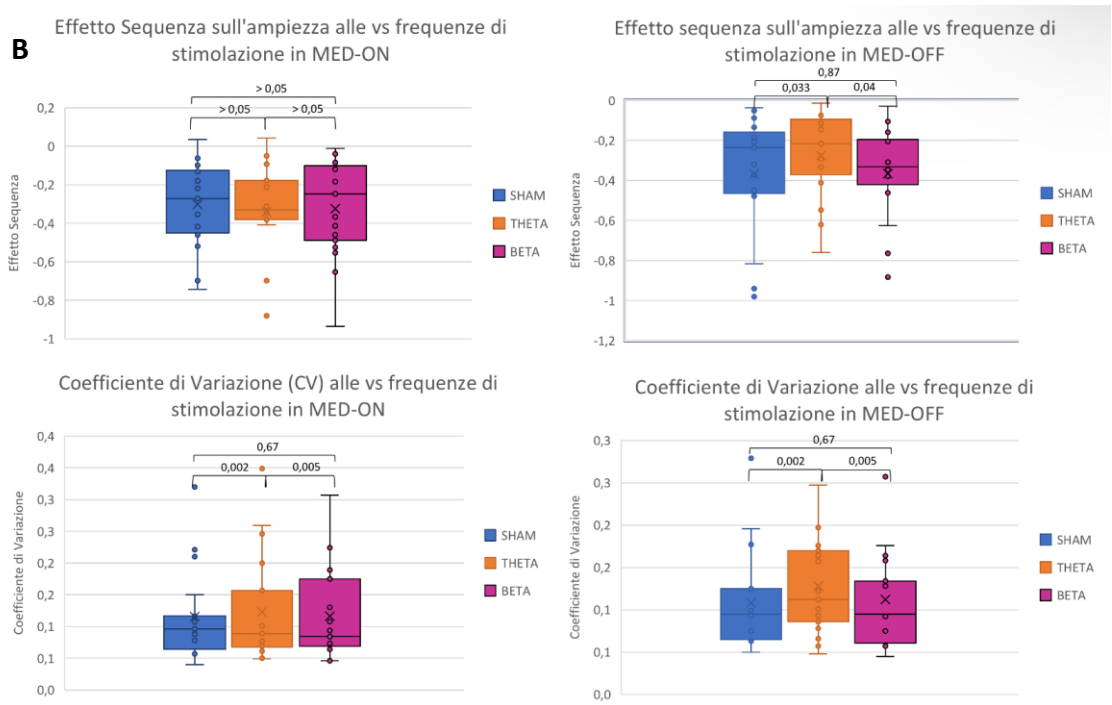


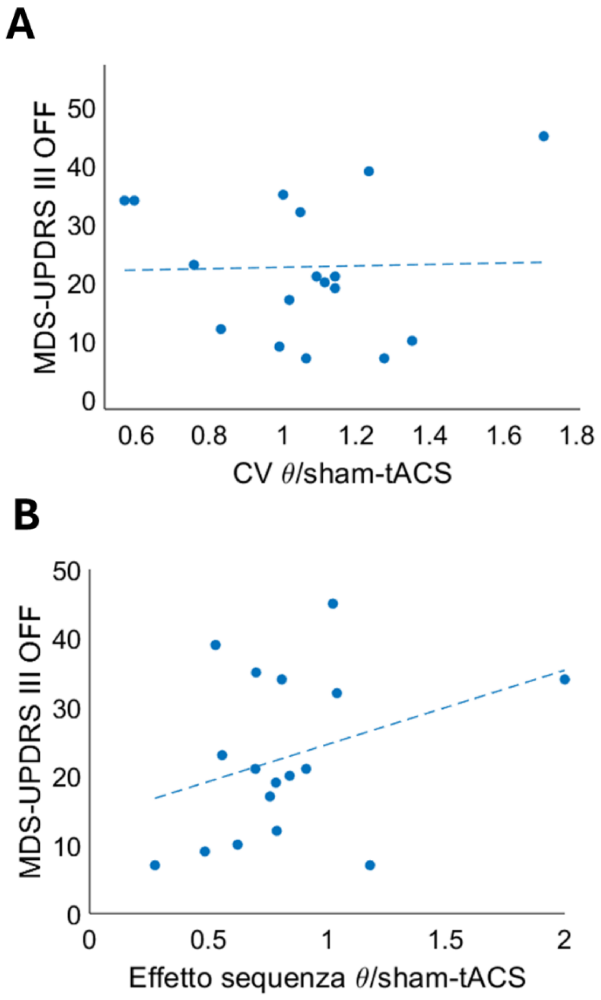
Figura 8. (A) Confronto tra i parametri cinematici tra pazienti MP in OFF farmacologico e soggetti sani di controllo (HC) in condizione sham-tACS, (B) Confronto tra le diverse frequenze di stimolazione (sham, θ, β) nella modulazione dei parametri cinematici considerati: effetto sequenza e coefficiente di variazione.

6.3 - CORRELAZIONI CLINICO-NEUROFISIOLOGICHE

Analizzando le associazioni tra l'effetto della θ-tACS sui parametri cinematici modulati durante la stimolazione (CV e decremento dell'ampiezza) e la gravità dei sintomi motori (punteggio MDS-UPDRS III) in stato OFF, non sono state identificate correlazioni significative.

In particolare, la correlazione di Spearman tra il rapporto tra il CV tra θ- e sham-tACS e il punteggio totale della scala MDS-UPDRS III (stato OFF) non ha mostrato una relazione significativa (R = –0.09, p=0.72) indicando che l'effetto della stimolazione su tale parametro è indipendente dalla gravità dei sintomi motori. Inoltre, sebbene sia stata osservata una lieve correlazione positiva (R = 0.25) tra i cambiamenti dell'effetto sequenza con θ-tACS (rapporto tra il decremento dell'ampiezza del movimento tra θ- e sham-tACS) e i sintomi motori (MDS-UPDRS III in fase OFF), questa non è risultata statisticamente significativa (p=0.32). (Figura 9)

Ciò indica che, anche in questo caso, la modulazione della θ-tACS sull'effetto sequenza sui pazienti MP non dipende dalla gravità dei sintomi motori.



F*igura 9. Correlazioni clinico-neurofisiologiche.* ***A)*** *Correlazione tra il punteggio della scala MDS-UPDRS III (fase OFF) e i cambiamenti del coefficiente di variazione (CV) indotti da θ-tACS (CV θ-tACS/CV sham-tACS).* ***B)*** *Correlazione tra la gravità globale dei sintomi motori (MDS-UPDRS III) ed il rapporto tra il decremento dell'ampiezza del movimento (effetto sequenza) durante θ-tACS e sham-tACS.*

7 - DISCUSSIONE

Nel presente studio sono stati valutati i potenziali effetti della tACS cerebellare in pazienti con MP, ponendo attenzione sulla bradicinesia, sintomo cardine della patologia. L'analisi di parametri cinematici ottenuti durante finger tapping ha consentito di valutare la modulazione indotta da tACS applicata alle frequenze θ e β sulle caratteristiche della bradicinesia, nonché l'eventuale interazione con lo stato farmacologico (OFF e ON levodopa).

Questo studio ha dimostrato due importanti risultati. In primo luogo, i nostri dati dimostrano che la tACS cerebellare applicata alla frequenza θ (5 Hz) determina un'attenuazione dell'effetto sequenza, ovvero la progressiva riduzione dell'ampiezza del movimento tipica della MP. Tale miglioramento è emerso in maniera significativa solo nello stato OFF farmacologico, mentre non sono state rilevate differenze rispetto alla sham-tACS nello stato ON. In secondo luogo, è stato osservato che la θ-tACS produce un aumento significativo del CV (indicativo del peggioramento della ritmicità del movimento) rispetto a una stimolazione placebo (sham-tACS). Tale effetto è risultato indipendente dall'assunzione di levodopa. Entrambi gli effetti sono frequenza-specifici, verificandosi solo in frequenza θ e non in β, e parametro-specifici, essendo modulati esclusivamente questi due parametri cinematici. Infatti, la stimolazione tACS alle frequenze θ e β non ha prodotto alcun effetto significativo sulle altre caratteristiche del movimento testate, quali il numero totale di movimenti eseguiti, l'ampiezza e la velocità del movimento, indipendentemente dallo stato farmacologico dei pazienti. Questi parametri cinematici sono risultati significativamente compromessi nei pazienti con MP rispetto ai soggetti sani di controllo, e sono stati modulati positivamente e significativamente dall'assunzione di levodopa, confermando la forte dipendenza di questi sintomi dal tono dopaminergico. Come già evidenziato in studi precedenti [44], la modulazione di parametri cinematici specifici con la tACS cerebellare supporta l'idea che i diversi parametri del movimento non riflettono l'attività delle stesse aree o meccanismi neurofisiologici simili negli esseri umani, ma possano essere codificati da reti distinte e processi neuronali diversi.

L'interpretazione fisiopatologica di questi dati converge su un ruolo dello specifico accoppiamento frequenza-dipendente tra la tACS e le proprietà risonanti del cervelletto. È stato dimostrato che gli effetti della stimolazione si manifestano solo se sono presenti popolazioni neuronali in grado di entrare in risonanza con le frequenze endogene. Nel cervelletto, studi precedenti hanno evidenziato come le cellule granulari presentino proprietà oscillatorie intrinseche nel range di frequenza θ. Si può pertanto ipotizzare che la θ-tACS possa modulare l'attività cerebellare inducendo l'*entrainment*

dell'attività delle cellule granulari, che determinerebbe un aumento dell'inibizione delle cellule di Purkinje sui nuclei cerebellari profondi, in grado di modulare l'output dei circuiti cerebello-talamo-corticali [34].

Il risultato principale dello studio riguarda il miglioramento dell'effetto sequenza osservato durante θ-tACS, deponendo a favore di quanto recentemente appurato da diversi progetti di ricerca riguardo i benefici clinici sulla bradicinesia ottenibile tramite stimolazione diretta ed indiretta che si traduce in un aumento della risonanza oscillatoria cerebellare entro frequenze in banda θ. Infatti, secondo recenti studi, tale attività oscillatoria a bassa frequenza potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio nei confronti del circuito cortico-striato-talamico [45] danneggiato e disfunzionale nei pazienti affetti da MP rispetto ai soggetti sani [46]. Sembra, ad esempio, che la DBS del STN, sia in grado di modulare indirettamente l'attività oscillatoria cerebellare in banda θ, in modo analogo al suo effetto sulle oscillazioni corticali [46], con beneficio sintomatologico. La modulazione elettrica esterna in tale banda di frequenza mediante θ-tACS potrebbe in ultima analisi, mediante i meccanismi precedentemente descritti, modulare alcune delle aree cerebellari coinvolte nel network della bradicinesia [24], come i lobuli IV–V–VI e il verme IV–V, già identificati in precedenti studi in correlazione con le dinamiche dell'effetto di sequenza [47]. La modulazione della θ-tACS è risultata differente in base allo stato del paziente. Infatti, la stimolazione riduce l'effetto sequenza esclusivamente nello stato OFF (in assenza di assunzione di levodopa), mentre non vi era lo stesso effetto nello stato ON. Una possibile spiegazione del fatto che il miglioramento di questo parametro del movimento si evidenzi solo nello stato OFF, è il cosiddetto "ceiling effect": nello stato ON farmacologico, il miglioramento dell'effetto sequenza potrebbe essere già in parte imputabile all'assunzione di levodopa, limitando ulteriori miglioramenti. Al contrario, in assenza di levodopa, il cervelletto potrebbe assumere un ruolo compensatorio nella regolazione del movimento, e potrebbero quindi risultare più evidenti gli effetti della modulazione elettrica esterna. In questo modo verrebbe mascherato l'effetto della tACS su questo parametro. Questa interpretazione è coerente con modelli recenti che evidenziano come la tACS possa avere un impatto più marcato in condizioni di ridotta attività dopaminergica, in cui la rete cerebello-talamo-corticale risulta maggiormente disaccoppiata e quindi più modulabile.

Un altro risultato del nostro studio riguarda il dato che la θ-tACS influenza negativamente la ritmicità del movimento nei pazienti con MP. Questo risultato è in linea con precedenti evidenze su soggetti sani [44], che hanno dimostrato che la θ-tACS cerebellare riduce specificamente la regolarità del movimento, in particolare durante la fase di continuazione di un compito di finger tapping. Questo

fenomeno è stato associato al potenziamento dell'inibizione cerebello-corticale (*Cerbellar Brain Inhibition*, CBI), ipotizzando che la stimolazione abbia indotto un output inibitorio cerebellare eccessivo verso M1, alterandone l'attività e compromettendo la sua capacità di generare comandi motori costanti e precisi, necessari per mantenere un ritmo stabile. Il peggioramento della ritmicità del movimento durante θ-tACS potrebbe essere anche interpretato come un effetto "collaterale" del miglioramento dell'effetto sequenza. L'attenuazione del calo in ampiezza del movimento nel task motorio al ripetersi della sua esecuzione cinematicamente si traduce in un'aumentata dinamica al singolo movimento, che può verificarsi a discapito della regolarità del movimento. Di nota, questo risultato appare indipendente dall'assunzione di levodopa, essendo presente in egual misura in entrambe le condizioni farmacologiche OFF e ON.

L'assenza di un effetto chiaro su altri parametri cinematici (es. ampiezza e velocità del movimento), unitamente alla specificità di frequenza, supporta l'idea che componenti diverse del movimento siano sostenute da meccanismi neurofisiologici e circuiti parzialmente distinti. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che la tACS cerebellare, alle intensità e con la configurazione impiegate, sia in grado di modulare i parametri del movimento in pazienti con MP. Tuttavia, la modulazione dell'attività cerebellare potrebbe agire primariamente sui meccanismi di temporizzazione e di coordinazione del movimento piuttosto che sui determinanti di "vigore" (ampiezza e velocità medie), che restano prevalentemente dopamino-dipendenti. In prospettiva, la tACS cerebellare potrebbe configurarsi come un complemento della terapia farmacologica mirato a domini motori specifici.

7.1 - FATTORI CONFONDENTI E POSSIBILI LIMITAZIONI DELLO STUDIO

In questo studio sperimentale sono stati identificati e controllati possibili fattori che avrebbero potuto influenzare i risultati. In primo luogo, sono stati inclusi solo pazienti con una diagnosi di MP secondo i più recenti criteri internazionali, escludendo pazienti con comorbidità neurologiche e psichiatriche aggiuntive [27]. Durante le valutazioni cinematiche, è stato garantito un periodo di riposo tra le prove motorie per minimizzare possibili effetti di affaticamento. Per la stimolazione tACS, è stata utilizzata una condizione sham come condizione di controllo che è stata applicata in ordine randomizzato con le due condizioni di stimolazione (θ-tACS e β-tACS) [48]. Ciò ci consente di escludere che effetti aspecifici o placebo abbiano influenzato i risultati ottenuti. La maggior parte dei pazienti non ha riportato sensazioni visive né cutanee significative durante nessuna delle frequenze tACS esaminate, che avrebbero potuto influenzare la performance motoria. Inoltre, la

valutazione cinematica è stata eseguita da due ricercatori, uno incaricato della registrazione cinematica, l'altro del settaggio dei parametri di stimolazione tACS. Questi accorgimenti hanno garantito un disegno sperimentale in doppio cieco, aumentando l'affidabilità dei risultati ottenuti. Inoltre, per valutare l'effetto della levodopa sulla modulazione del movimento, lo stato di OFF farmacologico è stato ottenuto con sospensione prolungata dei farmaci dopaminergici (>12 ore). Inoltre, al fine di ottenere una condizione di ON farmacologico affidabile, tutti i pazienti hanno assunto la propria dose abituale di levodopa e sono stati valutati dopo un'ora, in accordo con la cinetica del farmaco.

Il presente studio di tesi presenta alcune limitazioni. Il campione ridotto limita la generalizzabilità dei risultati, così come l'assenza di una valutazione a lungo termine non consente di stabilire la durata degli effetti indotti dalla stimolazione. Infine, l'utilizzo di un montaggio a due elettrodi limita la focalità della stimolazione, rendendo utile, in studi futuri, l'impiego di configurazioni ad alta definizione (tACS ad alta definizione) per una modulazione più mirata.

8 - CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che la tACS applicata al cervelletto può modulare in modo selettivo il controllo temporale del movimento nella MP. In particolare, la θ-tACS ha attenuato l'effetto sequenza, ma ha peggiorato la regolarità del ritmo; quest'ultimo effetto si potrebbe spiegare come una conseguenza "cinematica" del miglioramento dell'effetto sequenza. Tali effetti sono risultati frequenza- e parametro-specifici, infatti ampiezza e velocità del movimento sono stati modulati unicamente dalla levodopa e non dalla tACS. Nel complesso, i dati suggeriscono che la tACS cerebellare agisca soprattutto sui meccanismi di temporizzazione e coordinazione del movimento, più che sui determinanti del vigore motorio. Inoltre, i dati suggeriscono che le oscillazioni θ a livello cerebellare abbiano un ruolo nella fisiopatologia della bradicinesia, possibilmente favorendo meccanismi di tipo compensatorio. Da un punto di vista traslazionale, i risultati sostengono il cervelletto come target non invasivo per intervenire su domini motori specifici della MP, potenzialmente in modo complementare alla terapia dopaminergica

Bibliografia

[1] Y. B.-S. e. al, «The epidemiology of Parkinson's disease,» *Lancet,* 2024.

[2] E. e. a. Tolosa, «Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease.,» *The Lancet Neurology,.,* pp. 20(5), 385-397., 2021.

[3] e. a. Kouli A, «Parkinson's Disease: etiology, neuropathology, and pathogenesis,» *Codon Publications eBooks [Internet],* pp. p. 3-26, 2018.

[4] C. e. a. Klein, «Genetics of Parkinson's Disease Christine,» *Cold Spring Harb. Perspect. Med,* pp. 2,91-100, 2012.

[5] A. M. e. al, «Diagnosis and treatment of Parkinson disease,» *JAMA, Internet,* p. 11;323(6):548, 2020.

[6] H. G. e. al, «Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies,» *Acta Neuropathologica,* pp. 122,187-204, 2011.

[7] B. H. e. al, «Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease,» *Neurobiol Aging,* pp. 24,197-211, 2003.

[8] P. e. al, «The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders,» *Trends in Neurosciences,* pp. 12(10):366-75, 1989.

[9] C. e. al, «Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal,» *Nat Neurosci 17,* p. 1022–1030, 2014.

[10] e. a. DeLong, «Primate Models of Movement Disorders of Basal Ganglia Origin,» *Trends in Neurosciences,* pp. 13(7):281-85, 1990.

[11] N. e. al, «Functional Significance of Cortico-Subthalamo-Pallidal “Hypedirect” Pathway,» *Neuroscience Research,* pp. 43(2):111-17, 2002.

[12] R. D. e. al, «Functional and Pathophysiological Models of the Basal Ganglia,» *Current Opinion in Neurobiology,* pp. 6(6):751-58., 1996.

[13] J. L. e. al, «AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY,» *Brain,* pp. 114(5):2283-2301, 1991.

[14] F. G. e. al, «Brain oscillations and Parkinson disease,» *Handbook of Clinical Neurology [Internet].,* pp. 259-71, 2022.

[15] P. RB, «Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come,» *Mov Disord.,* 2019.

[16] E. D'Angelo, « Physiology of the cerebellum,» *Handbook of Clinical Neurology,* pp. 154, 85-108, 2018.

[17] E. e. a. D'Angelo, «Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: From circuit operations to cognition,» *Frontiers in Neural Circuits,* 2013.

[18] T. e. a. Chen, «Impulsivity Trait Profiles in Patients With Cerebellar Ataxia and Parkinson Disease,» *Neurology 99,* p. 2022, e176–e186.

[19] M. e. a. Hurley, «Markers for dopaminergic neurotransmission in the cerebellum in normal individuals and patients with Parkinson's disease examined by RT-PCR,» *Neurosci,* pp. 18, 2668–2672, 2003.

[20] A. e. a. De Benedictis, «Networking del cervelletto umano: dallo sviluppo anatomo-funzionale alle implicazioni neurochirurgiche,» *Front. Neurol,* pp. 13 , 806298, 2022.

[21] B. A. e. al, «The cerebellum and basal ganglia are interconnected.,» *Neuropsychol Rev,* 2010.

[22] S. e. al, «Compensatory striatal-cerebellar connectivity in mild-moderate Parkinson's disease,» *Neuroimage Clin,* pp. 10 , 54–62, 2016.

[23] B. M. e. al, «Evolving concepts on bradykinesia,» *Brain,* 2020.

[24] B. M. e. al, «The pathophysiology of Parkinson's disease tremor.,» *J Neurol Sci,* 2022.

[25] C. H. e. al, «Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits?,» *Brain,* 2012.

[26] L. S. A. e. al, «Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art.,» *Ageing Res Rev,* 2023.

[27] e. a. Postuma, «MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease,» *Mov Disord.,* 2015.

[28] A. e. a. Berardelli, «EFNS/MDS-ES recommendations for the diagnosis of,» *Eur. J. Neurol,* 2013.

[29] S. e. al, «Premotor, non motor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art,» *Ageing Research Reviews,* 2023.

[30] A. e. a. Antonini, «Developing consensus among movement disorder specialists on clinical indicators for identification and management of advanced Parkinson's disease: a multi-country Delphi-panel approach.,» *Current Medical Research and Opinion,* 2018.

[31] C. KL, «The spectrum of "off" in Parkinson's disease: what have we learned over 40 years?,» *Parkinsonism Relat Disord,* 2018.

[32] C. e. a. FC, «Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease.,» *Biomolecules,* 2021.

[33] Vijiaratnam, «Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease,» *Lancet Neurol.,* 2021.

[34] S. V. e. al, «Effects of cerebellar transcranial alternating current stimulation on balance and gait in healthy subjects,» *Clin Neurophysiol,* 2025.

[35] Antal, «Transcranial alternating current stimulation (tACS),» *Frontiers in Human Neuroscience,* 2013.

[36] Oswal, «Towards therapeutic non-invasive electrical modulation of brain circuits in Parkinson's disease,» *Brain,* 2022.

[37] S. e. al, «Transcranial Direct Current Stimulation to Ameliorate Post-Stroke Cognitive Impairment,» *Brain Sciences,* 2024.

[38] R. al., «Using transcranial direct-current stimulation (tDCS) to understand cognitive processing.,» *Attention, perception & psychophysics,* 2017.

[39] M. e. a. Hallett, «Properties of oscillatory neuronal activity in the basal ganglia and thalamus in patients with Parkinson's disease,» *Transl Neurodegener,* 2018.

[40] F. N. e. al, «Non-invasive suppression of essential tremor via phase-locked disruption of its temporal coherence,» *Nature Communications,* 2021.

[41] G. e. al, «Theta-tACS modulates cerebellar-related motor functions and cerebellar-cortical connectivity,» *Clinical Neurophysiology,* 2024.

[42] N. A. e. al, «Does Transcranial Alternating Current Stimulation Induce Cerebellum Plasticity? Feasibility, Safety and Efficacy of a Novel Electrophysiological Approach,» *Brain Stimul,* 2016.

[43] S. D. e. al, «Frequency-dependent modulation of cerebellar excitability during the application of non-invasive alternating current stimulation.,» *Brain Stimul.,* 2021.

[44] A. G. e. al, «Theta-tACS modulates cerebellar-related motor functions and cerebellar-cortical connectivity,» *Clinical Neurophysiology,* 2024.

[45] D. G. e. al, «Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network.,» *Neuron.,* 2009.

[46] B. T. e. al, «Resting-State Low-Frequency Cerebellar Oscillations Can Be Abnormal in Parkinson's Disease.,» *Cerebellum.,* 2022.

[47] S. E. e. al, «Neural correlates of bradykinesia in Parkinson's disease: a kinematic and functional MRI study,» *NPJ Parkinsons Dis.,* 2024.

[48] G. A. e. al, «Driving motor cortex oscillations modulates bradykinesia in Parkinson's disease,» *Brain,* 2022 .

[49] A. A. e. al, «Low intensity transcranial electric stimulation: Safety, ethical, legal regulatory and application guidelines,» *Clin Neurophysiol.,* 2017.