

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia**

Dipartimento di Neuroscienze

**Tesi di Laurea**

## **MARCATORI DI DISAUTONOMIA IN PAZIENTI CON MALATTIA DI PARKINSON E ATROFIA MULTISISTEMICA**

Relatore: Prof. Angelo Antonini

Correlatrice: Dott.ssa Marta Campagnolo

Laureanda: Michela Massarotto

*Anno Accademico 2023/2024*



# Indice

<b>Riassunto</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>5</b>
1.1 Le $\alpha$ -sinucleinopatie .....	5
1.2 Malattia di Parkinson.....	6
1.2.1 Epidemiologia, eziologia e patogenesi .....	6
1.2.2 Clinica.....	9
1.2.3 Criteri diagnostici .....	11
1.2.4 Prognosi .....	12
1.2.5 Trattamento .....	12
1.3 Atrofia multisistemica .....	15
1.3.1 Epidemiologia, eziologia e patogenesi .....	15
1.3.2 Clinica.....	17
1.3.3 Criteri diagnostici .....	19
1.3.4 Prognosi .....	23
1.3.5 Trattamento .....	23
1.4 Accertamenti diagnostici nelle $\alpha$ -sinucleinopatie.....	27
1.4.1 Neuroimaging .....	27
1.4.2 Nuovi biomarcatori.....	29
1.5 Disfunzione autonoma nelle $\alpha$ -sinucleinopatie .....	34
1.5.1 Disfunzione autonoma cardiovascolare .....	35
1.5.2 Alterazioni della termoregolazione.....	40
1.5.3 Disfunzione autonoma gastrointestinale .....	41
1.5.4 Disfunzione genitourinaria .....	42
<b>2 Scopo dello studio</b> .....	<b>43</b>
<b>3 Materiali e metodi</b> .....	<b>44</b>
3.1 Popolazione .....	44
3.2 Valutazione clinica .....	44
3.2.1 Scala MDS-UPDRS .....	45
3.2.2 Scala UMSARS .....	46
3.2.3 COMPASS 31 .....	47

3.2.4 Valutazione neuropsicologica .....	48
3.3 Neuroimaging .....	49
3.4 Valutazione autonoma.....	49
3.4.1 Ecografia dell'addome inferiore.....	49
3.4.2 Monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 h .....	50
3.4.3 ECG dinamico secondo Holter 24 h.....	51
3.4.4 Scintigrafia miocardica con [123I] MIBG .....	51
3.4.5 Test autonomici cardiovascolari.....	52
3.5 Biopsia di cute.....	56
3.5.1 Immunoistochimica .....	56
3.6 Analisi statistica .....	57
<b>4 Risultati .....</b>	<b>58</b>
4.1 Caratteristiche demografiche della popolazione di studio .....	58
4.2 - Valutazione clinica .....	59
4.2.1 Scala MDS-UPDRS nei pazienti con PD .....	59
4.2.2 Scala UMSARS nei pazienti con MSA.....	59
4.2.3 Scala COMPASS31 .....	60
4.2.4 Valutazione neuropsicologica .....	61
4.3 Neuroimaging .....	62
4.4 Valutazione autonoma.....	62
4.4.1 Ecografia dell'addome inferiore con calcolo del residuo post-minzionale (RPM) .....	62
4.4.2 Monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 h .....	63
4.4.3 ECG dinamico secondo Holter 24 h.....	65
4.4.4 Scintigrafia miocardica con [123I] MIBG .....	65
4.4.5 Test autonomici cardiovascolari.....	65
4.5 Biopsia di cute.....	72
<b>5 Discussione .....</b>	<b>76</b>
<b>6 Conclusioni.....</b>	<b>82</b>
<b>7 Bibliografia.....</b>	<b>84</b>





## Riassunto

**Presupposti:** La malattia di Parkinson (PD) e l'atrofia multisistemica (MSA) sono due patologie che possono essere caratterizzate da manifestazioni cliniche simili, tra cui la disfunzione autonoma. Questo aspetto rende difficile e tardiva la diagnosi differenziale, con implicazioni nel trattamento dei pazienti e nella loro inclusione in *trial* clinici. Inoltre, il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo impatta sulla qualità della vita dei pazienti e, talvolta, sulla loro sopravvivenza, in particolare quando la compromissione interessa il dominio cardiovascolare. Questi elementi rendono necessaria l'identificazione di caratteristiche specifiche delle due patologie, anche tramite indagini strumentali, a supporto della diagnosi che è principalmente clinica.

**Scopo dello studio:** definire le caratteristiche della disfunzione autonoma nella malattia di Parkinson e nell'atrofia multisistemica. Identificare, tramite valutazione clinica e strumentale standardizzata, gli aspetti che possano supportare la diagnosi differenziale tra le due patologie, con focus sul coinvolgimento del sistema nervoso autonomo urinario e cardiovascolare.

**Materiali e metodi:** Pazienti con PD e MSA sono stati valutati clinicamente tramite la scala COMPASS31 per i sintomi disautonomici e, rispettivamente, mediante le scale MDS-UPDRS e UMSARS per stimare il grado di severità della malattia. Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a valutazione neuropsicologica e a neuroimaging. Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a calcolo del volume residuo post-minzionale tramite ecografia dell'addome inferiore per valutare la funzione urinaria. Al fine di valutare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo cardiovascolare sono stati eseguiti il monitoraggio pressorio continuo delle 24h, l'ECG dinamico secondo Holter delle 24 h, la scintigrafia miocardica con [123I] MIBG e i test autonomi cardiovascolari. In un sottogruppo di pazienti è stata eseguita la biopsia di cute.

**Risultati:** La valutazione clinica della disfunzione autonoma tramite COMPASS-31 ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella funzione

urinaria tra i due gruppi di pazienti. Il residuo post-minzionale calcolato all'ecografia dell'addome inferiore è risultato maggiore nel gruppo con MSA rispetto al gruppo con PD ma la differenza non è statisticamente significativa. Il monitoraggio continuo della pressione arteriosa delle 24h ha mostrato la presenza di alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa nell'85.7% dei pazienti con PD e nel 70% dei pazienti con MSA. I test autonomici cardiovascolari non hanno rilevato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti. Tra i parametri dei test autonomici cardiovascolari, è emersa una correlazione significativa solo tra i valori della pressione arteriosa sistolica e diastolica in clinostatismo all'*head up tilt test* e il punteggio del dominio OH del COMPASS-31. Nel 37.5% dei pazienti con MSA sottoposti a scintigrafia miocardica con [123I] MIBG, l'esame è risultato alterato. La biopsia di cute non ha rilevato depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata nel 33.3% dei pazienti con MSA esaminati. È emerso che i pazienti risultati negativi per p-syn hanno una durata media di malattia superiore rispetto ai soggetti positivi. Nel 44.4% dei pazienti con MSA le fibre del sistema nervoso autonomo sono risultate positive per l' $\alpha$ -sinucleina fosforilata. Non sono state evidenziate differenze significative nella localizzazione dei depositi patologici di  $\alpha$ -sinucleina nelle biopsie di cute tra i due gruppi di pazienti.

**Conclusioni:** Gli accertamenti strumentali eseguiti per indagare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo, urinario e cardiovascolare, e la biopsia di cute non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti. Questo evidenzia la necessità di proseguire le indagini con studi più ampi al fine di identificare *markers* specifici di ciascuna malattia. L'elevata frequenza di alterazioni rilevata tramite gli accertamenti diagnostici suggerisce l'importanza dell'introduzione nella pratica clinica di routine di una valutazione standardizzata della funzione autonoma.



## Abstract

**Background:** Parkinson's disease (PD) and multiple system atrophy (MSA) are disorders that share similar clinical features, including autonomic dysfunction. Because of this, differential diagnosis can be difficult and late, with implications for patients' treatment and their inclusion in clinical trials. Moreover, involvement of the autonomic nervous system impacts patients' quality of life and, sometimes, their survival, particularly when the impairment affects the cardiovascular domain. These elements would require identifying specific disease features through instrumental investigations to support the diagnosis, which is mainly clinical.

**Aim of the study:** To define the features of autonomic dysfunction in Parkinson's disease and multiple system atrophy. To identify, through standardized clinical and instrumental assessment, aspects that can support the differential diagnosis between disorders, focusing on the involvement of urinary and cardiovascular autonomic nervous system.

**Methods:** PD and MSA patients were assessed clinically using the COMPASS-31 score to evaluate dysautonomic symptoms and, respectively, by means of MDS-UPDRS and UMSARS scores to estimate disease severity. A subgroup of patients underwent neuropsychological assessment and neuroimaging evaluation. A subgroup of patients underwent post-void residual volume evaluation using ultrasound to assess urinary function. In order to assess the involvement of the cardiovascular autonomic nervous system, ambulatory blood pressure monitoring, Holter ECG 24h, [123I] MIBG cardiac scintigraphy and cardiovascular autonomic tests were performed. Skin biopsy was performed in a subgroup of patients.

**Results:** The clinical assessment of autonomic dysfunction using COMPASS-31 score showed a statistically significant difference in urinary function between the two groups of patients. The post-void residual volume, evaluated using ultrasound, was higher in the group with MSA than in the group with PD, but the difference was not statistically significant. Ambulatory blood pressure monitoring showed the

presence of disruption of blood pressure circadian rhythm in 85.7% of patients with PD and 70% of patients with MSA. Cardiovascular autonomic tests revealed no statistically significant differences between the two groups of patients. Among the parameters of cardiovascular autonomic tests, a significant correlation emerged only between the systolic and diastolic blood pressure values in the supine position during head-up tilt test and the OH domain score of COMPASS-31. In 37.5% of patients with MSA who underwent [123I] MIBG cardiac scintigraphy, it was impaired. Skin biopsy did not detect phosphorylated  $\alpha$ -synuclein deposits in 33.3% of MSA patients examined. It was found that patients who tested negative for p-syn had a longer average duration of disease than positive patients. In 44.4% of patients with MSA, the autonomic nervous system fibers were positive for phosphorylated  $\alpha$ -synuclein. There were no statistically significant differences in the localization of pathological  $\alpha$ -synuclein deposits in skin biopsies between the two groups of patients.

**Conclusions:** Instrumental examinations performed to investigate involvement of autonomic nervous system and skin biopsy showed no statistically significant differences between the two groups. This highlights the need to continue investigations with larger studies in order to identify specific markers of disease. The high frequency of abnormalities detected in the study shows the need to routinely introduce diagnostic assessments to investigate autonomic system.

# 1 Introduzione

## 1.1 Le $\alpha$ -sinucleinopatie

Le  $\alpha$ -sinucleinopatie sono un gruppo di patologie neurodegenerative che comprende l'insufficienza autonoma pura (PAF), la malattia di Parkinson (PD), la demenza a corpi di Lewy (DLB) e l'atrofia multisistemica (MSA) (1), tutte caratterizzate dalla deposizione nelle cellule in diverse regioni del sistema nervoso centrale e periferico di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina che assume una conformazione patologica. La possibilità di individuare entità clinicamente distinte all'interno di questo gruppo di patologie è dovuta al fatto che sono stati identificati differenti pattern di deposizione dell' $\alpha$ -sinucleina in specifiche popolazioni cellulari. Nella malattia di Parkinson e nella Demenza a corpi di Lewy gli aggregati patologici di  $\alpha$ -sinucleina si riscontrano tipicamente nei neuroni del sistema nervoso centrale; in base alla localizzazione, a livello del soma e assonale, vengono denominati rispettivamente corpi di Lewy e neuriti di Lewy. Nell'insufficienza autonoma pura, l' $\alpha$ -sinucleina si deposita in periferia, a livello del sistema nervoso autonomo. L'atrofia multisistemica si caratterizza, invece, per la presenza di inclusioni citoplasmatiche oligodendrogliali nel sistema nervoso centrale. (1)

L' $\alpha$ -sinucleina è una proteina di 140 residui amminoacidici, codificata dal gene SNCA e normalmente presente nei neuroni, principalmente a livello dei terminali presinaptici; la sua funzione non è ancora completamente compresa, ma si ritiene abbia un ruolo cruciale nel favorire la fusione transitoria delle vescicole sinaptiche e sia coinvolta nel rilascio di neurotrasmettitori, fornendo un effetto stabilizzante sui complessi di proteine della famiglia SNARE (2). In soluzioni acquose, l' $\alpha$ -sinucleina è presente in una forma solubile *natively unfolded*, cioè priva di una struttura secondaria o terziaria ordinata, mentre assume una struttura a  $\alpha$ -elica quando interagisce con lipidi carichi negativamente, come i fosfolipidi di membrana. (2,3). Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, l' $\alpha$ -sinucleina assume una conformazione *misfolded* che la rende predisposta all'aggregazione: i monomeri solubili formano oligomeri, gradualmente convertiti in strutture fibrillari insolubili

ricche di foglietti  $\beta$ . (2) Recenti studi supportano la teoria secondo cui sia le strutture completamente fibrillari sia le specie oligomeriche intermedie siano neurotossiche. (3) Meccanismi identificati come potenzialmente responsabili del *misfolding* dell' $\alpha$ -sinucleina sono la fosforilazione della proteina a livello della serina 129 (4) e le mutazioni genetiche a carico di SNCA, codificanti per proteine aberranti. Inoltre, alterazioni nei meccanismi di degradazione (sistema ubiquitina-proteasoma e sistema autofagico lisosomiale) possono determinare l'accumulo dell' $\alpha$ -sinucleina, favorendone l'aggregazione; a loro volta, questi aggregati sono in grado di compromettere la funzione del proteasoma, innescando un circolo vizioso che supporta la neurodegenerazione. (5) Altri cambiamenti che si verificano nei neuroni in seguito all'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina sono l'alterazione dell'omeostasi del calcio e la frammentazione mitocondriale. (3)

Inoltre, gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina presenti all'interno dei neuroni hanno comportamento *prion-like*: possono essere trasportati tramite gli assoni in altre regioni cerebrali e rilasciati nello spazio extracellulare, dove possono essere assorbiti tramite endocitosi dai neuroni vicini; all'interno della nuova cellula, tali aggregati potrebbero indurre l'aggregazione della proteina, contribuendo alla progressione della patologia. (6)

## **1.2 Malattia di Parkinson**

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa ad andamento progressivo; i corpi di Lewy ne costituiscono il tratto istopatologico distintivo mentre il parkinsonismo è la sua manifestazione clinica caratteristica.

### **1.2.1 Epidemiologia, eziologia e patogenesi**

La malattia di Parkinson è la seconda patologia neurodegenerativa più frequente dopo la malattia di Alzheimer (7); la stima della prevalenza mondiale, complessivamente pari al 0.3%, raggiunge valori anche superiori al 3% negli ultraottantenni. (8) All'aumentare dell'età, l'incidenza assume valori crescenti: mentre la malattia è rara tra gli individui con meno di 50 anni, tra i 50 e i 59 anni

l'incidenza annuale è pari a 17.4/100000 e nella fascia d'età compresa tra 70 e 79 anni ammonta a 93/100000. (7) Negli anni, si è assistito ad un aumento sia in prevalenza che in incidenza della patologia e si prevede che questa tendenza si manterrà anche in futuro; le cause si possono identificare in una maggiore conoscenza della malattia, nel miglioramento dei metodi usati nell'iter diagnostico, nell'invecchiamento della popolazione e nell'industrializzazione, responsabile di una maggior esposizione a fattori ambientali. (7-9). La malattia di Parkinson è più comune negli uomini rispetto alle donne, probabilmente come conseguenza di un effetto protettivo degli ormoni sessuali femminili, differenze genetiche e nell'esposizione a fattori ambientali ma anche della disparità nell'assistenza sanitaria in alcuni Paesi del mondo. (8, 9)

Nella maggior parte dei casi, la malattia di Parkinson è idiopatica, con eziologia multifattoriale, determinata dall'interazione tra fattori genetici e ambientali. Per quanto riguarda i fattori ambientali, si è dimostrato un rischio aumentato in soggetti esposti a pesticidi; l'abitudine tabagica e la caffeina sembrerebbero, invece, essere associati a una riduzione del rischio, anche se il ruolo causale non è ancora stato stabilito in modo definitivo. Considerando i fattori genetici, nel 10-15% dei casi si riconosce una storia familiare positiva e in circa il 5% la patologia è monogenica, con ereditarietà mendeliana. Ad oggi, sono stati identificati 23 geni potenzialmente associati alla malattia di Parkinson, denominati PARK. Nelle forme monogeniche, l'ereditarietà può essere autosomica dominante o autosomica recessiva. La forma autosomica dominante più frequente è causata da mutazioni del gene LRRK2 mentre le cause più comuni delle forme autosomiche recessive sono le mutazioni di PRKN. (7) Classicamente, la malattia sporadica ha esordio nella sesta decade di vita, con durata media di 7-14 anni dalla diagnosi; le forme monogeniche si associano a esordio più precoce rispetto ai casi sporadici, con comparsa dei sintomi anche tra i 20 e i 40 anni.

La caratteristica neuropatologica principale della malattia di Parkinson è la degenerazione e perdita neuronale a livello della *pars compacta* della *substantia nigra*. La sostanza nera è un nucleo di sostanza grigia localizzato nel mesencefalo che insieme a caudato, putamen, *globus pallidus* interno, *globus pallidus* esterno e nucleo subtalamico di Lewis costituisce i gangli della base. Una delle principali

funzioni dei gangli della base è quella di garantire l'avvio e lo svolgimento del movimento; questo ruolo si esplica tramite due circuiti neurali, chiamati via diretta e via indiretta. La via diretta esita nell'eccitazione della corteccia, facilitando l'inizio del movimento e lo svolgimento dello stesso. La corteccia genera un segnale eccitatorio diretto allo striato (composto da caudato e putamen), il quale inibisce il globo pallido interno; quest'ultimo contiene un neurone inibitorio GABAergico, che proietta al talamo. Essendo il globo pallido interno inibito dallo striato, viene meno la sua azione inibitoria sul talamo, che proietta alla corteccia con stimolo eccitatorio. La via indiretta, invece, frena il movimento tramite l'inibizione della corteccia. La corteccia invia un segnale eccitatorio allo striato attivando il neurone GABAergico inibitorio, il quale inibisce il neurone del globo pallido esterno, che a sua volta avrebbe azione inibitoria sul nucleo subtalamico di Lewis; quest'ultimo, attivato dalla doppia inibizione, può esplicitare la sua azione eccitatoria sul pallido interno, che inibisce il talamo; pertanto, non vi è facilitazione della corteccia. La *pars compacta* della *substantia nigra* contiene neuroni dopaminergici che proiettano allo striato, costituendo la via nigro-striatale. I neuroni dello striato presentano recettori della dopamina distinti a seconda del circuito di cui fanno parte. Nei neuroni coinvolti nella via indiretta sono espressi recettori D2 inibitori mentre nei neuroni dello striato che rientrano nella via diretta sono presenti recettori D1 eccitatori.

Nella malattia di Parkinson, la morte dei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della *substantia nigra* determina livelli ridotti di dopamina nello striato, con conseguente disabilitazione della via diretta e facilitazione della via indiretta. L'aumentata inibizione del talamo e, di conseguenza, della corteccia spiega le manifestazioni motorie caratteristiche della patologia, che in genere, compaiono quando circa il 30% dei neuroni dopaminergici sono andati incontro a degenerazione. (10). Il segno patologico distintivo della malattia di Parkinson è la presenza di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina nel citoplasma dei neuroni, denominati corpi di Lewy. Nel 2003, Braak et al. hanno ipotizzato che lo *spreading* dell' $\alpha$ -sinucleina avvenga secondo una sequenza definita cronologicamente prevedibile, identificando sei stadi di malattia. Negli stadi 1 e 2, i corpi di Lewy si localizzano principalmente nel nucleo motorio dorsale, nel nucleo olfattivo anteriore e nella

formazione reticolare, giustificando i sintomi precoci quali iposmia e disturbo del sonno REM (RBD). Negli stadi 3-4, la neurodegenerazione interessa progressivamente la parte compatta della sostanza nera, il locus coeruleus, l'amigdala e la corteccia limbica temporale, manifestandosi clinicamente con la comparsa dei sintomi motori. Negli stadi 5-6, la distribuzione dei corpi di Lewy diventa diffusa, coinvolgendo anche la corteccia prefrontale e le aree motorie e sensoriali primarie. (11) Il riscontro di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata in numerosi siti al di fuori del SNC ha suggerito l'ipotesi che i depositi patologici possano formarsi primariamente anche a livello del sistema nervoso enterico o periferico, invadendo solo successivamente il sistema nervoso centrale mediante trasporto retrogrado attraverso il nervo vago. (12)

## **1.2.2 Clinica**

### **a. Parkinsonismo**

Le caratteristiche cliniche cardine della malattia di Parkinson sono la bradicinesia, la rigidità muscolare e il tremore a riposo; questi elementi costituiscono la sindrome clinica definita parkinsonismo. (13)

La bradicinesia è la caratteristica fondamentale, in assenza della quale non si può parlare di parkinsonismo. Per bradicinesia si intende la lentezza nell'esecuzione del movimento e la riduzione dell'ampiezza di movimenti ripetitivi. Oltre alla lentezza nei movimenti e nella deambulazione, altre espressioni della bradicinesia sono l'ipomimia, l'ipofonia, la micrografia e, nelle fasi di malattia più avanzate, la difficoltà nel deglutire. L'ipomimia, che consiste nella riduzione dell'ammiccamento e della mimica facciale, è dovuta all'interessamento dei muscoli facciali mentre l'ipofonia consegue a una maggiore rigidità delle corde vocali.

La rigidità muscolare è un segno obiettivabile come resistenza dei muscoli al movimento passivo svolto dall'esaminatore. L'ipertono extrapiramidale si mantiene uguale durante l'intera escursione del movimento ed è velocità-indipendente; queste caratteristiche consentono di distinguerlo dalla spasticità (ipertono piramidale).

Il tremore a riposo è definito *rolling pills* o contar monete: è ritmico, ha frequenza di 4-6 Hz e tipicamente cessa con l'azione. Esso costituisce il classico sintomo d'esordio della malattia nel 70% dei casi. È asimmetrico all'esordio e il lato interessato per primo rimarrà il più colpito, anche se con l'evoluzione della malattia potrà essere interessato anche il controlaterale. (14)

La perdita dei riflessi posturali e l'alterazione della marcia solitamente compaiono più tardivamente rispetto alle altre manifestazioni motorie; anomalie tipiche durante la deambulazione sono l'anteroflessione del tronco associata ad una riduzione o abolizione delle sincinesie, la riduzione dell'ampiezza dei passi, la festinazione della marcia, la *start hesitation* e il *freezing* all'avvio della marcia.

#### b. Sintomi non motori

La presentazione della malattia di Parkinson include anche sintomi non motori, in particolare disturbi del sonno, iposmia, sintomi neuropsichiatrici (quali depressione, apatia, ansia) e disautonomici. (15) L'iposmia, la stipsi, i disturbi del sonno e la depressione spesso anticipano l'esordio dei sintomi motori, costituendo la fase prodromica della malattia. Gli altri sintomi non motori in genere emergono con la progressione della malattia e compaiono nelle fasi avanzate, compromettendo la qualità di vita, anche a causa della loro scarsa responsività alla terapia dopaminergica sostitutiva.

I principali disturbi del sonno riferiti dai pazienti sono insonnia, sonnolenza diurna e i disturbi del sonno REM (RBD). L'RBD si manifesta clinicamente con incubi, sogni vividi, vocalizzazioni e movimenti anomali durante il sonno come risultato della perdita della normale atonia muscolare durante il sonno REM. Questo disturbo si verifica in circa un terzo dei pazienti mentre fino al 50% riferisce eccessiva sonnolenza diurna; anche se si ritiene che l'eziologia di questi disturbi sia multifattoriale, un ruolo importante è probabilmente rivestito dalla degenerazione dei centri di regolazione del sonno centrali nel tronco cerebrale e delle vie talamocorticali. (16,17)

L'iposmia, rilevata in oltre il 90% dei pazienti, si ritiene essere secondaria alla presenza dei corpi di Lewy a livello dei bulbi olfattivi.



I sintomi neuropsichiatrici più frequenti sono depressione, anedonia, apatia, ansia, psicosi, allucinazioni e disfunzioni cognitive fino alla demenza.

Le principali manifestazioni di disfunzione autonoma includono stipsi, disfunzione genitourinaria e ipotensione ortostatica. (15)

### 1.2.3 Criteri diagnostici

Nel 2015, l'*International Movement Disorder Society* (MDS) ha elaborato dei criteri diagnostici per la malattia di Parkinson, al fine di migliorare la riproducibilità nella ricerca ma anche per fornire un'utile guida alla diagnosi nella pratica clinica. (13,18) Secondo questi criteri, il prerequisito fondamentale per poter porre diagnosi di malattia di Parkinson è la presenza di parkinsonismo, definito come bradicinesia, in combinazione con rigidità, tremore a riposo o entrambi. Una volta diagnosticata la sindrome clinica, sulla base di criteri di inclusione, criteri di esclusione e *red flags* è possibile stabilire se il parkinsonismo è attribuibile alla malattia di Parkinson o se è necessario indagare una diagnosi alternativa.

#### Suppl. material - MDS Criteria for a Clinical Diagnosis of PD (Postuma et al. 2015)

<p><b>Presence of a parkinsonian syndrome by expert clinical exam</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bradykinesia</i> plus at least one out of:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>4-6-Hz rest tremor, limb rigidity</i></li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Supportive clinical criteria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Excellent response to levodopa</li> <li>• Presence of levodopa-induced dyskinesia</li> <li>• Rest tremor of a limb</li> <li>• Presence of either olfactory loss or sympathetic cardiac denervation (MIBG scintigraphy)</li> </ul>
<p><b>Exclusion criteria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unequivocal cerebellar signs</li> <li>• Downward vertical gaze palsy</li> <li>• Diagnosis of FTD (<i>behavioral variant or PPA</i>) within 5 years</li> <li>• Parkinsonism restricted to legs for &gt; 3 yrs.</li> <li>• Exposure to anti-DA drugs consistent with (dose, timing) drug-induced parkinsonism</li> <li>• Absence of L-Dopa response</li> <li>• Cortical sensory loss, limb apraxia, progressive aphasia</li> <li>• Normal functional imaging of presynaptic DA system</li> </ul>
<p><b>'Red Flags' for alternative Dx</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid progression of gait impairment (wheelchair within five years)</li> <li>• No progression over 5 yrs</li> <li>• Severe dysphonia, dysarthria or dysphagia within 5 years.</li> <li>• Inspiratory stridor</li> <li>• Severe autonomic failure within 5 years (symptomatic OH, urinary incontinence or retention)</li> <li>• Recurrent falls within 3 years</li> <li>• Disproportionate antecollis or limb contractures within 10 years</li> <li>• Absence of typical PD non-motor symptoms over 5 years</li> <li>• Persistent motor symmetry</li> </ul>

Figura 1. Criteri MDS per la diagnosi clinica di malattia di Parkinson. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al., MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015. (13)

Sulla base di questi criteri, la malattia di Parkinson può essere diagnosticata con due distinti livelli di certezza: malattia di Parkinson clinicamente stabilita e malattia di Parkinson clinicamente probabile.

La diagnosi di malattia di Parkinson clinicamente stabilita richiede, oltre al riscontro di parkinsonismo, almeno due criteri di supporto, l'assenza di criteri di esclusione e l'assenza di *red flags*.

La diagnosi di malattia di Parkinson clinicamente probabile richiede, oltre al riscontro di parkinsonismo, l'assenza di criteri di esclusione e la presenza di al massimo due *red flags*, controbilanciate da altrettanti criteri di supporto.

Da uno studio di validazione dei criteri diagnostici proposti dalla MDS, è emerso che la diagnosi di PD clinicamente stabilita si associa a una specificità del 98.5% e una sensibilità 59.3% mentre la diagnosi di PD clinicamente probabile ha dimostrato una specificità del 95% e una sensibilità del 96%. (18)

#### **1.2.4 Prognosi**

La malattia di Parkinson è una malattia neurodegenerativa con decorso progressivo. Una metanalisi basata su studi post-mortem ha dimostrato eterogeneità nella durata di malattia, con una media stimata tra 6.9 e 14.3 anni. (9,19). La più frequente causa di morte correlata alla patologia è la polmonite *ab ingestis*, anche se spesso il decesso del paziente avviene per motivi indipendenti dalla malattia di Parkinson e legati ad altre comorbidità. (9)

#### **1.2.5 Trattamento**

##### a. Sintomi motori

La Levodopa, un precursore della dopamina in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e agire sul recettore D2 dopo attivazione enzimatica, è la terapia di prima linea per trattare i sintomi motori nei pazienti affetti da malattia di Parkinson. Questo farmaco viene somministrato in associazione a inibitori dell'enzima dopa-decarbossilasi periferico, per evitare che la levodopa venga completamente metabolizzata da questo enzima prima di raggiungere il sistema nervoso centrale. (20) L'assunzione della levodopa, soprattutto ad alte dosi, può complicarsi con fluttuazioni motorie e discinesie, la cui causa probabilmente è da

imputare alla discontinuità nella stimolazione del recettore dopaminergico. Dopo 5 anni dall'inizio dell'assunzione della terapia, più del 50% dei pazienti sviluppano queste complicazioni. (8)

I farmaci dopamino-agonisti modulano direttamente il recettore dopaminergico, senza necessità di attivazione enzimatica. Hanno un effetto complessivo inferiore rispetto alla levodopa ma un'emivita superiore. Pertanto, possono essere somministrati in associazione alla levodopa in pazienti con fluttuazioni motorie o in monoterapia durante le fasi precoci di malattia. Il loro potenziale effetto collaterale principale consiste nella perdita del controllo degli impulsi, probabilmente per eccessiva attivazione del circuito della ricompensa in seguito alla stimolazione del recettore D3 a livello dello striato ventrale.

Anche farmaci che inibiscono la degradazione della dopamina, tra cui gli inibitori delle catecol-O-aminotransferasi e gli inibitori dell'enzima monoamino-ossidasi B (MAO-B), sono frequentemente associati alla levodopa per prolungarne l'emivita e, di conseguenza, i benefici; se la malattia è nelle fasi iniziali, gli inibitori dell'enzima monoamino-ossidasi B possono essere usati anche in monoterapia.

Alcuni sintomi motori, in particolare tremore, *freezing* della marcia, instabilità posturale, disartria e disfagia, non sono responsivi alla levodopa; pertanto, si possono tentare altri approcci farmacologici. Ad esempio, per il tremore si possono somministrare farmaci anticolinergici, da usare con cautela considerati i possibili effetti collaterali sulle funzioni cognitive.

Oltre alla modulazione della terapia dopaminergica, al fine di ridurre le discinesie può essere usata l'amantidina, antagonista del recettore del glutammato N-metil-D-aspartato (NMDA). Sono state approvate dalla FDA due preparazioni di amantidina a rilascio prolungato mentre la preparazione a rilascio immediato è usata off-label. (9) I pazienti che presentano fluttuazioni motorie o discinesie non responsive alle modifiche della terapia farmacologica possono essere candidati a terapie avanzate tra cui la stimolazione cerebrale profonda (DBS), gli ultrasuoni focalizzati guidati da risonanza magnetica e l'infusione enterale di levodopa-carbidopa. La stimolazione cerebrale profonda prevede il posizionamento chirurgico di elettrodi unilateralmente o bilateralmente nel nucleo subtalamico o nel *globus pallidus*

interno. Sintomi motori non responsivi alla terapia dopaminergica sono predittivi anche di una mancata risposta alla DBS, ad eccezione del tremore, il quale può migliorare posizionando gli elettrodi a livello del talamo. (21)

Ad oggi, non sono disponibili nella pratica clinica trattamenti *disease-modifying*, cioè in grado di modificare la progressione della malattia di Parkinson. La ricerca si sta concentrando sullo sviluppo di nuove terapie con target l' $\alpha$ -sinucleina, considerato il suo ruolo centrale nella patogenesi della malattia. Sono oggetto di trial clinici approcci immunologici basati sull'immunizzazione attiva mediante vaccini contenenti brevi peptidi omologhi all' $\alpha$ -sinucleina coniugati a un vettore (tecnologia AFFITOPE), volti a indurre la formazione di anticorpi specificamente diretti contro la proteina patologica. Sono in corso anche trial clinici sull'immunizzazione passiva mediante anticorpi monoclonali contro l' $\alpha$ -sinucleina, con lo scopo di bloccare l'aggregazione patologica. (8)

#### b. Sintomi non motori

I sintomi non motori generalmente non rispondono alla terapia dopaminergica e richiedono terapia sintomatica diversa. (8)

La gestione della psicosi si basa sulla modulazione dei farmaci che possono aggravarla, tra cui i dopamino-agonisti e gli inibitori delle MAO-B; se ciò non è sufficiente, si possono usare farmaci antipsicotici, in particolare pimavanserina, clozapina e quetiapina. L'unico tra questi il cui uso è stato approvato dall'FDA per il trattamento della psicosi nella malattia di Parkinson è la pimavanserina, un agonista inverso selettivo del recettore della serotonina 5-HT<sub>2A</sub>. L'efficacia della clozapina è stata dimostrata da numerosi trial clinici randomizzati mentre la quetiapina è usata comunemente nella pratica clinica in quanto facilmente prescrivibile, nonostante numerosi studi non abbiano dimostrato benefici dal suo utilizzo nei pazienti affetti da malattia di Parkinson. (8,22)

Nel trattamento della depressione possono essere usati inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), inibitori della ricaptazione di serotonina e noradrenalina (SNRI) e antidepressivi triciclici (TCA) mentre nessun farmaco è

risultato specificamente efficace nel trattare i disturbi del sonno associati alla malattia di Parkinson. (22)

Per quanto riguarda i sintomi disautonomici, l'ipotensione ortostatica può essere gestita con misure comportamentali, tra cui evitare i pasti abbondanti, i cambi di postura troppo rapidi e le temperature molto elevate, aumentare l'introito idrico e l'apporto dietetico di sale; qualora non siano sufficienti, si può ricorrere al trattamento con agenti simpaticomimetici come la midodrina. L'urgenza minzionale viene trattata con farmaci antimuscarinici mentre, in caso di incompleto svuotamento vescicale, si possono usare agenti colinergici. La stipsi può migliorare aumentando l'apporto idrico e di fibre, anche se spesso richiede l'uso di lassativi.

### **1.3 Atrofia multisistemica**

L'atrofia multisistemica (MSA) è una patologia neurodegenerativa rapidamente progressiva, a prognosi infausta con exitus nell'arco di 6-10 anni. (23) Le inclusioni citoplasmatiche gliali (GCI) ne costituiscono il tratto istopatologico distintivo mentre dal punto di vista clinico si caratterizza per una combinazione variabile di parkinsonismo, atassia cerebellare e disfunzione autonoma. In base al fenotipo clinico predominante tra parkinsonismo e atassia cerebellare, si distinguono due sottotipi a cui si fa riferimento rispettivamente con MSA-P e MSA-C.

#### **1.3.1 Epidemiologia, eziologia e patogenesi**

L'atrofia multisistemica è considerata una malattia rara, la cui prevalenza varia da 1.9 a 3.3 casi per 100000 persone (23); la stima dell'incidenza media annuale è 0.6 casi per 100000 persone (24), ma si è evidenziata ampia variabilità in relazione alla popolazione e alla regione geografica considerata. (25) Le differenze etniche e geografiche si rilevano anche nella presentazione clinica della malattia: nei Paesi occidentali, il sottotipo parkinsoniano (MSA-P) è il più frequente mentre nelle popolazioni asiatiche, in particolare in Giappone, la variante predominante è quella cerebellare (MSA-C). (23) La malattia colpisce in egual misura i due sessi; in

media, l'esordio avviene durante la sesta decade di vita e il decesso si verifica dopo 6-10 anni. (23)

L'atrofia multisistemica è considerata una malattia sporadica ad eziologia sconosciuta. Pur essendo riportati casi con una storia familiare confermata tramite autopsia, le indagini volte a identificare le varianti genetiche correlate a malattia hanno portato a risultati contrastanti. (23). Nonostante alcuni studi abbiano indagato il ruolo di pesticidi, solventi e metalli nello sviluppo della patologia, non è ancora stato individuato alcun fattore ambientale o occupazionale in grado di modificare il rischio di malattia. (25)

L'atrofia multisistemica è una  $\alpha$ -sinucleinopatia oligodendrogliale: l'*hallmark* istopatologico della malattia è rappresentato da inclusioni citoplasmatiche oligodendrogliali (note come GCIs), anche chiamate corpi di Papp-Lantos; (26) inclusioni nucleari oligodendrogliali e inclusioni neuronali possono essere presenti ma sono meno frequenti. Le GCIs sono costituite da un core centrale formato da un aggregato di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata a livello della serina 129, combinato a diverse altre proteine, tra cui la fosfoproteina p25 $\alpha$ . (24) Nonostante il meccanismo patogenetico della malattia sia in gran parte sconosciuto, si ritiene che un ruolo cruciale sia ricoperto dalla fosfoproteina p25 $\alpha$ , uno stabilizzatore dell'integrità della mielina normalmente associato all'MBP. La rilocalizzazione di p25 $\alpha$  dalla guaina mielinica al corpo cellulare degli oligodendrociti è seguita da un aumento del contenuto di  $\alpha$ -sinucleina, secondario a un suo *uptake* anomalo o una eccessiva espressione della stessa; l'interazione tra le due proteine sembrerebbe favorire la fosforilazione e l'aggregazione della  $\alpha$ -sinucleina, portando alla formazione delle inclusioni citoplasmatiche gliali. (26, 27) La presenza di queste inclusioni citoplasmatiche provoca un danno a carico degli oligodendrociti stessi, che perdono progressivamente la loro funzione di supporto trofico agli assoni. Gli oligodendrociti danneggiati rilasciano nello spazio extracellulare gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina, i quali possono andare incontro ad *uptake* da parte dei neuroni vicini. La perdita del supporto neurotrofico, la disfunzione secondaria alla presenza degli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina e l'infiammazione causano la morte dei neuroni, seguita da astrogliosi reattiva.

Nella MSA-P, la perdita neuronale interessa maggiormente il sistema nigrostriatale; inizialmente, la degenerazione è limitata alla *substantia nigra*, coinvolgendo successivamente il putamen e, infine, il caudato e il *globus pallidus*. Nella MSA-C, la neurodegenerazione è principalmente a carico delle proiezioni olivo-ponto-cerebellari. Inizialmente, si verifica una perdita delle cellule di Purkinje e una degenerazione della sostanza nera, seguita dal coinvolgimento del ponte, delle olive inferiori e, infine, del verme e degli emisferi cerebellari. Inoltre, la perdita neuronale interessa anche le strutture del sistema nervoso autonomo a livello centrale, tra cui l'ipotalamo, il nucleo dorsale del nervo vago, i nuclei del tronco encefalico noradrenergico e serotoninergico, il nucleo ambiguo e il nucleo di Onuf.

La severità di malattia correla con il grado di perdita neuronale, che sembra a sua volta dipendere dalla densità delle inclusioni citoplasmatiche gliali. (28)

### **1.3.2 Clinica**

Clinicamente, l'atrofia multisistemica si presenta con una combinazione variabile di sintomi e segni di disfunzione autonoma, parkinsonismo e coinvolgimento cerebellare.

#### **a. Parkinsonismo**

Nei pazienti con MSA, le manifestazioni cliniche preponderanti del parkinsonismo sono la bradicinesia e la rigidità muscolare; a differenza della malattia di Parkinson, l'instabilità posturale compare precocemente ed evolve rapidamente nel corso della patologia. In circa il 50% dei casi può essere presente un irregolare tremore posturale e cinetico con sovrapposto mioclono, mentre il tremore a riposo *pill rolling* è infrequente. A causa della progressiva e rapida degenerazione dello striato, caratteristica tipica di questo parkinsonismo è la scarsa risposta alla terapia cronica con levodopa, nonostante il 40% dei pazienti tragga un iniziale beneficio dal trattamento dopaminergico sostitutivo. Si parla di MSA-P quando queste manifestazioni costituiscono la caratteristica motoria predominante nel quadro clinico.

### b. Atassia cerebellare

L'atassia cerebellare consiste in un deficit di coordinazione ed equilibrio, secondario alla neurodegenerazione delle strutture olivo-ponto-cerebellari. In particolare, la manifestazione più frequente è l'atassia della marcia, caratterizzata da instabilità e deambulazione a base allargata, accompagnata dalla disartria, con frammentazione dell'eloquio e parola scandita. In genere, le anomalie oculomotorie più precoci includono saccadi ipometriche e movimenti oculari di inseguimento a scatti mentre il nistagmo compare più tardivamente. (29) I pazienti possono presentare anche atassia degli arti con movimenti non coordinati e tremore d'azione. Se l'atassia cerebellare è la principale manifestazione motoria si parla di MSA-C. (30)

Soprattutto nelle fasi avanzate, segni e sintomi del parkinsonismo e dell'atassia cerebellare possono presentarsi contemporaneamente nello stesso paziente e la caratteristica motoria predominante può cambiare con la progressione della malattia. (29)

In una quota di pazienti compresa tra il 30% e il 50%, si possono riscontrare iperreflessia generalizzata e segno di Babinski; comuni sono anche le deformità assiali, tra cui la camptocormia e la sindrome di Pisa. (25) Disfagia, disfonia e cadute frequenti sono tipiche delle fasi avanzate di malattia.

### c. Sintomi non motori

La disfunzione autonoma è un aspetto chiave dell'atrofia multisistemica; coinvolge principalmente gli apparati cardiovascolare e genitourinario, con manifestazioni precoci e tendenzialmente severe (26).

In circa il 75% dei pazienti, i sintomi disautonomici precedono l'esordio delle manifestazioni motorie, costituendo la fase prodromica della malattia. (1,31)

L'ipotensione ortostatica severa, principale espressione dell'insufficienza adrenergica, può essere asintomatica oppure manifestarsi con debolezza, sensazioni di vertigini, nausea, sensazione di tremore o di dolore alla nuca e sincope al passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo. Circa il 50% dei pazienti affetti da MSA presenta anche ipertensione supina, definita come pressione arteriosa >140/90



mmHg in clinostatismo, e ipotensione post-prandiale. (32) La disfunzione erettile è presente all'esordio in quasi la totalità dei pazienti di sesso maschile mentre la disfunzione urinaria si presenta con urgenza e frequenza minzionale, incontinenza e incompleto svuotamento vescicale fino alla ritenzione di urina. (29)

Altre possibili manifestazioni di disfunzione autonoma sono ipoidrosi o anidrosi, alterazioni vasomotorie principalmente a carico delle estremità, intolleranza alla luce per alterazione dei riflessi pupillomotori e disturbi secretomotori quali xerostomia, xeroftalmia e scialorrea. La stipsi è il disturbo dell'apparato gastrointestinale più comune; altri sintomi che i pazienti possono riferire sono diarrea, dolori addominali, sensazione di ripienezza precoce, nausea e vomito.

Tra i disturbi respiratori si riscontrano la sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS) e lo stridor, definito come un suono respiratorio acuto e aspro, principalmente inspiratorio, presente solo durante il sonno o sia durante il sonno sia durante la veglia, causato da disfunzione laringea che porta al restringimento della rima glottide. (33) Il 50% dei pazienti lamenta dolore debilitante. (26)

I disturbi del sonno REM in genere precedono l'esordio dei sintomi motori mentre i sintomi neuropsichiatrici compaiono nelle fasi avanzate di malattia; i sintomi neuropsichiatrici più frequenti sono i deficit dell'attenzione, presenti in 1/3 dei pazienti e secondari alla degenerazione del lobo frontale, l'incontinenza emotiva e i disturbi del comportamento. (34)

### **1.3.3 Criteri diagnostici**

Non è infrequente che l'atrofia multisistemica sia oggetto di misdiagnosi: a causa della bassa prevalenza della malattia e della sovrapposizione delle manifestazioni cliniche, la diagnosi differenziale con malattia di Parkinson, atassie cerebellari idiopatiche insorte tardivamente e insufficienza autonoma pura risulta difficile. (25)

Nel 1998 una *consensus conference* ha stabilito i criteri diagnostici dell'atrofia multisistemica, che sono stati modificati nel 2008, alla luce dei progressi e delle nuove conoscenze in ambito clinico, laboratoristico, neuropatologico e di imaging. (29) A causa dell'accuratezza diagnostica subottimale dei criteri del 2008, pari a

62%-79% secondo i dati di due recenti studi (35,36), l'*International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS) ha proposto nel 2022 una nuova revisione dei criteri diagnostici dell'MSA, definendo quattro livelli di certezza diagnostica: MSA neuropatologicamente stabilita, MSA clinicamente stabilita, MSA clinicamente probabile e MSA prodromica possibile. (37)

La diagnosi di MSA neuropatologicamente stabilita, corrispondente alla "MSA definita" dei criteri del 2008, richiede l'evidenza neuropatologica di inclusioni citoplasmatiche gliali positive per  $\alpha$ -sinucleina (inclusioni di Papp-Lantos) associata a cambiamenti neurodegenerativi nelle strutture nigrostriatali o olivoponto-cerebellari; la diagnosi di MSA neuropatologicamente stabilita può essere posta solo post-mortem mediante autopsia.

La diagnosi di MSA clinicamente stabilita richiede una malattia con esordio in età adulta (>30 anni), sporadica e progressiva caratterizzata da:

- disfunzione autonoma, definita dalla presenza di almeno un aspetto tra difficoltà di svuotamento della vescica con un volume residuo post-minzionale (PVR) superiore a 100 mL, incontinenza urinaria da urgenza o ipotensione ortostatica neurogena (nOH) entro 3 minuti dall'assunzione della posizione eretta o dall'inclinazione passiva all'*head up tilt test*.
- almeno una caratteristica tra parkinsonismo scarsamente responsivo alla levodopa (bradicinesia con rigidità, tremore o instabilità posturale) e sindrome cerebellare (atassia della marcia con disartria cerebellare, atassia degli arti o disfunzione oculomotoria cerebellare).
- almeno due caratteristiche cliniche motorie o non motorie di supporto; (Figura 2)
- almeno un marker di risonanza magnetica cerebrale suggestivo di MSA;
- assenza di criteri di esclusione. (Figura 3)

La diagnosi di MSA clinicamente probabile richiede una malattia con esordio in età adulta (>30 anni), sporadica e progressiva caratterizzata da:

- almeno due caratteristiche cliniche principali, in qualsiasi combinazione, tra disfunzione autonoma (definita da almeno un aspetto tra difficoltà di svuotamento della vescica con residuo post-minzionale di qualsiasi volume, incontinenza urinaria da urgenza e ipotensione ortostatica neurogena ritardata con comparsa entro 10 minuti dall'assunzione attiva della posizione eretta o durante *head up tilt test*), parkinsonismo (indipendentemente dalla risposta alla levodopa) e compromissione cerebellare;
- almeno una caratteristica clinica motoria o non motoria di supporto; (Figura 2)
- assenza di criteri di esclusione. (Figura 3)

Supportive clinical features			
Supportive motor features	Rapid progression within 3 years of motor onset	Supportive non-motor features	Stridor
	Moderate to severe postural instability within 3 years of motor onset		Inspiratory sighs
	Craniocervical dystonia induced or exacerbated by L-dopa in the absence of limb dyskinesia		Cold discolored hands and feet
	Severe speech impairment within 3 years of motor onset		Erectile dysfunction (below age of 60 years for clinically probable MSA)
	Severe dysphagia within 3 years of motor onset		Pathologic laughter or crying
	Unexplained Babinski sign		
	Jerky myoclonic postural or kinetic tremor		
	Postural deformities		

*Figura 2. Caratteristiche cliniche di supporto nella diagnosi di MSA clinicamente stabilita e MSA clinicamente probabile. Wenning GK et al., The Movement Disorder Society Criteria for the Diagnosis of Multiple System Atrophy. Mov Disord. 2022. (37)*

Exclusion criteria
Substantial and persistent beneficial response to dopaminergic medications
Unexplained anosmia on olfactory testing
Fluctuating cognition with pronounced variation in attention and alertness and early decline in visuoperceptual abilities
Recurrent visual hallucinations not induced by drugs within 3 years of disease onset
Dementia according to DSM-V within 3 years of disease onset
Downgaze supranuclear palsy or slowing of vertical saccades
Brain MRI findings suggestive of an alternative diagnosis (eg, PSP, multiple sclerosis, vascular parkinsonism, symptomatic cerebellar disease, etc.)
Documentation of an alternative condition (MSA look-alike, including genetic or symptomatic ataxia and parkinsonism) known to produce autonomic failure, ataxia, or parkinsonism and plausibly connected to the patient's symptoms

Figura 3. Criteri di esclusione nella diagnosi di MSA clinicamente stabilita e MSA clinicamente probabile. Wenning GK et al., *The Movement Disorder Society Criteria for the Diagnosis of Multiple System Atrophy*. *Mov Disord*. 2022. (37)

Si parla di MSA possibile prodromica in caso di una malattia con esordio in età adulta (>30 anni), sporadica e progressiva, caratterizzata da:

- almeno una caratteristica clinica non motoria tra RBD (dimostrato tramite polisonnografia), ipotensione ortostatica neurogena entro 10 minuti dall'assunzione della posizione eretta o durante *head up tilt test* e disfunzione genitourinaria. La disfunzione genitourinaria è definita come disfunzione erettile in uomini di età < 60 anni in combinazione con almeno un elemento tra difficoltà minzionali inspiegabili con residuo post-minzionale >100 ml e *urge incontinence* senza altra causa;
- almeno una caratteristica clinica motoria tra segni di parkinsonismo lievi e segni cerebellari lievi;
- assenza di criteri di esclusione. (Figura 4)

<b>Exclusion criteria</b>
At least one of unexplained anosmia on olfactory testing or abnormal cardiac sympathetic imaging ( <sup>123</sup> I-MIBG-scintigraphy)
Fluctuating cognition with pronounced variation in attention and alertness and early decline in visuo-perceptual abilities
Recurrent visual hallucinations not induced by drugs within 3 years of disease onset
Dementia according to DSM-V within 3 years of disease onset
Downgaze supranuclear gaze palsy or slowing of vertical saccades
Brain MRI findings suggestive of an alternative diagnosis (eg, PSP, multiple sclerosis, vascular parkinsonism, symptomatic cerebellar disease, etc.)
Documentation of an alternative condition (MSA look-alike, including genetic or symptomatic ataxia and parkinsonism) known to produce autonomic failure, ataxia, or parkinsonism and plausibly connected to the patient's symptoms

*Figura 4. Criteri di esclusione nella diagnosi di MSA prodromica possibile. Wenning GK et al., The Movement Disorder Society Criteria for the Diagnosis of Multiple System Atrophy. Mov Disord. 2022. (37)*

### **1.3.4 Prognosi**

L'atrofia multisistemica è una patologia fatale caratterizzata da un decorso rapido e aggressivo; a partire dall'esordio dei sintomi, la durata media di malattia varia tra 6 e 10 anni. (23) Il decesso è spesso conseguenza di episodi infettivi a carico delle vie respiratorie, anche in seguito ad alterazioni della deglutizione (polmoniti ab ingestis), o delle vie urinarie. La morte improvvisa, più frequente durante la notte e caratterizzata da arresto respiratorio, può verificarsi nei pazienti con MSA a causa di una paralisi acuta bilaterale delle corde vocali o della disfunzione acuta del centro di controllo del respiro nel tronco encefalico.

### **1.3.5 Trattamento**

L'ampio spettro di manifestazioni cliniche possibili rende complessa la gestione dei pazienti affetti da atrofia multisistemica e richiede un intervento multidisciplinare, con collaborazione di diverse figure professionali. (6)

Attualmente, nella pratica clinica non sono disponibili terapie *disease modifying*, cioè in grado di modificare il decorso della patologia, che sono oggetto di trials clinici in corso. Pertanto, il trattamento è principalmente sintomatico, includendo approcci, farmacologici e non farmacologici, adattati al quadro clinico di ogni singolo paziente. Purtroppo, la maggior parte di queste strategie terapeutiche ha un basso livello di evidenza, essendo pochi i trial clinici controllati disponibili.

#### a. Sintomi motori

Nel trattamento del parkinsonismo, la levodopa rappresenta il farmaco di scelta (25), anche se la sua efficacia è molto minore rispetto a quella nella malattia di Parkinson. La risposta al farmaco è in genere di breve durata e decresce nel tempo. Inizialmente, tra il 30% e il 70% dei pazienti trae beneficio dalla levodopa ma questo effetto si mantiene a più di due anni dalla diagnosi solo in una quota di pazienti compresa tra il 13% e il 34% (23, 38). Nonostante ciò, a meno di effetti collaterali gravi, non è raccomandata la sospensione completa del trattamento con levodopa, che può occasionalmente indurre un peggioramento improvviso e talvolta irreversibile dei sintomi motori. (25) Fino al 50% dei pazienti con MSA che rispondono al farmaco possono manifestare fluttuazioni motorie e discinesie, in particolare distonia oro-facciale e cranio-cervicale. (39)

Gli agonisti della dopamina non sono farmaci di prima linea nel trattamento del parkinsonismo nell'atrofia multisistemica, in quanto hanno meno probabilità di fornire un beneficio motorio e sono più inclini a peggiorare l'ipotensione ortostatica rispetto alla levodopa, ma possono essere usati nei casi di distonia indotta dalla levodopa. Anche se le prove a supporto dell'efficacia dell'amantadina, un antagonista selettivo dei recettori NMDA, sono controverse, si potrebbe considerare in individui che non rispondono alla levodopa o associarla a questa nei pazienti che manifestano discinesie. (23, 25)

Per trattare i sintomi cerebellari non sono disponibili farmaci specifici con efficacia comprovata; il clonazepam può migliorare il mioclono o il tremore d'azione mentre effetti benefici di propranololo, baclofene, amantadina, gabapentin e aminopiridina sono stati descritti in segnalazioni aneddotiche. (40)

La disfagia, frequente nei pazienti con patologia avanzata, se lieve o moderata può essere gestita dal paziente e dal caregiver tramite igiene posturale e adeguamento della dieta mentre se è severa, il posizionamento della PEG può essere preso in considerazione, anche se l'impatto sulla sopravvivenza è dubbio. (41)

In associazione alla terapia farmacologica, strumenti utili sono la fisioterapia, con benefici sul controllo posturale e sulla rigidità, e la logopedia, con l'obiettivo di migliorare disartria, disfonia e la coordinazione tra respirazione e fonazione.

#### b. Sintomi non motori

Nella gestione dell'ipotensione ortostatica è, innanzitutto, importante educare il paziente ad adottare una serie di misure non farmacologiche, tra cui evitare i pasti abbondanti, i cambi di postura troppo rapidi e le temperature molto elevate. È utile anche aumentare l'introito idrico e l'apporto dietetico di sale e utilizzare calze elastiche (26). Per quanto riguarda la terapia medica, i farmaci con effetto ipotensivo dovrebbero essere sospesi, ridotti in termini di dosaggio o somministrati alla sera. Farmaci specifici per il trattamento sintomatico dell'ipotensione ortostatica neurogena sono midodrina e droxidopa, agenti simpaticomimetici in grado di aumentare la resistenza vascolare periferica. Al fine di espandere il volume intravascolare, può essere utilizzato off-label anche il fludrocortisone, agonista mineralcorticoide. (42)

*L'urge incontinence*, sintomo dovuto all'iperattività vescicale, viene trattata con agenti antimuscarinici. (26) In caso di refrattarietà alla terapia medica, le iniezioni di tossina botulinica nel muscolo detrusore si associano a miglioramento di tale sintomo (23). In caso di ritenzione urinaria e incompleto svuotamento vescicale, si possono somministrare agenti colinergici, per migliorare la contrattilità del muscolo detrusore, o antagonisti  $\alpha$ 1-adrenergici, con lo scopo di favorire il rilassamento dello sfintere liscio uretrale. Se il residuo post-minzionale supera i 100 ml, il trattamento raccomandato è la cateterizzazione intermittente autoindotta. Talvolta, nei pazienti con malattia avanzata, può diventare necessario il posizionamento di un catetere sovrapubico permanente.

Negli uomini, la disfunzione erettile può migliorare con l'assunzione di inibitori della fosfodiesterasi 5, tra cui il sildenafil; questi farmaci, agendo come vasodilatatori anche a livello sistemico, hanno come effetto collaterale drastici cali pressori ed esacerbazione o peggioramento dell'ipotensione ortostatica. Qualora questo si verifichi, si possono usare approcci alternativi come l'iniezione intracavernosa di prostaglandine vasodilatatrici.

Per migliorare la stipsi, importante è aumentare l'attività fisica, l'introito idrico giornaliero e l'apporto di fibre nella dieta.

Il trattamento dei pazienti con OSAS consiste nella pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP). La CPAP è usata anche come trattamento sintomatico per lo stridor inspiratorio notturno mentre la tracheotomia potrebbe essere richiesta qualora questo sintomo sia grave e persistente; è ancora poco chiaro se queste misure abbiano o meno impatto positivo sulla sopravvivenza.

Considerata la rapida progressione della malattia, uno degli obiettivi della ricerca attuale è l'individuazione di terapie *disease modifying*, cioè in grado di arrestare o almeno rallentare la progressione della malattia. Trials clinici randomizzati e controllati effettuati con diversi agenti farmacologici, tra cui l'inibitore della MAO-B rasagilina e il farmaco con azione anti-glutammatergica riluzolo, inibitori dell'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina come l'antibiotico rifampicina e strategie di supporto neurotrofico, tra cui la somministrazione intratecale di cellule staminali mesenchimali (43), sono risultati inconcludenti. (44, 45)

I nuovi approcci si concentrano sull'individuazione di farmaci in grado di arrestare il *misfolding* e l'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina, farmaci immunoterapici e agenti inibitori dell'infiammazione neurologica, in particolare dell'attivazione microgliale, del complesso NLRP3-inflammasoma e caspasi 1. La fase II di un trial clinico randomizzato controllato basato sull'uso dell'anticorpo monoclonale  $\alpha$ -sinucleina Lu AF82422 in pazienti con atrofia multisistemica è in corso (23); anche oligonucleotidi antisenso progettati per ridurre la produzione di  $\alpha$ -sinucleina sono oggetto della fase I di un trial clinico. (23)



## 1.4 Accertamenti diagnostici nelle $\alpha$ -sinucleinopatie

Le  $\alpha$ -sinucleinopatie possono avere manifestazioni cliniche simili tra loro, soprattutto nelle fasi precoci di malattia o in caso di presentazione atipica. Questo rende difficile e tardiva la diagnosi differenziale, in particolare tra malattia di Parkinson e atrofia multisistemica, con implicazioni nel trattamento dei pazienti e nella loro inclusione in trial clinici. Il ritardo diagnostico e la misdiagnosi iniziale sono piuttosto frequenti, come dimostrato da un'ampia serie di autopsie che ha riportato un'accuratezza diagnostica limitata solo al 62% nei pazienti affetti da atrofia multisistemica. (36) La diagnosi di queste patologie si basa principalmente su aspetti clinici ma gli esami strumentali possono essere utili per aumentare l'accuratezza diagnostica, soprattutto agli stadi iniziali. Tra questi rientrano neuroimaging ed esami per la valutazione della funzione autonoma (approfonditi nel paragrafo 1.5), a cui si aggiunge la ricerca di biomarcatori su fluidi biologici e campioni tissutali.

### 1.4.1 Neuroimaging

#### a. Risonanza magnetica

La risonanza magnetica fornisce misure oggettive della neurodegenerazione del SNC e rappresenta uno strumento utile nell'iter diagnostico della malattia di Parkinson e dell'atrofia multisistemica, supportando la diagnosi differenziale tra le due patologie. (46)

Nella malattia di Parkinson, la risonanza magnetica convenzionale, nelle sequenze standard pesate in T2 e T1 a 1.5 T, non evidenzia nessun riscontro specifico, per cui dovrebbe risultare normale o mostrare alterazioni dovute all'età, soprattutto negli stadi iniziali di malattia. (46) Con la progressione della malattia e la comparsa di compromissione cognitiva, si può osservare atrofia a carico delle strutture ippocampali e della corteccia cerebrale, in particolare nelle regioni frontali (47).

Il ruolo della risonanza magnetica nell'iter diagnostico della malattia di Parkinson è principalmente quello di escludere altre cause di parkinsonismo, indirizzando eventualmente verso una diagnosi alternativa. (46)

Nell'atrofia multisistemica, le sequenze convenzionali della risonanza magnetica possono evidenziare alterazioni tipiche quali atrofia del putamen, ipointensità del putamen con bordo putaminale laterale iperintenso nelle sequenze pesate in T2 e una serie di anomalie infratentoriali tra cui l'atrofia del ponte, del peduncolo cerebellare medio, del midollo allungato, delle olive inferiori e del cervelletto. Caratteristica è anche l'iperintensità in T2 a livello del ponte, segno definito *hot cross bun sign*, del peduncolo cerebellare medio e del cervelletto. (48) Confrontando MSA-P e MSA-C, le anomalie più frequenti e più precoci nelle due varianti sono quelle a carico del putamen in MSA-P e quelle infratentoriali in MSA-C. (46) La specificità di queste anomalie nel distinguere l'atrofia multisistemica dalla malattia di Parkinson è elevata mentre la sensibilità si è rivelata insufficiente, soprattutto nelle fasi iniziali di malattia. (46, 48)

La sequenza pesata in diffusione DWI è inclusa nei protocolli di RM cerebrale di routine. Nell'MSA-P, si possono rilevare alterazioni della diffusività del putamen, probabilmente espressione di un'importante perdita neuronale in questa sede. L'accuratezza diagnostica di questa alterazione nel differenziare l'atrofia multisistemica dalla malattia di Parkinson è elevata, con una sensibilità del 90% e una specificità del 93%. (49) Nell'MSA, la variazione della diffusività può interessare anche il peduncolo cerebrale medio ma i dati sulla sensibilità di questo reperto sono discordanti. (48) Anche l'evidenza di un accumulo di ferro nella regione interna e posteriore del putamen nelle sequenze di risonanza magnetica sensibili al ferro è un segno specifico di atrofia multisistemica (50).

Tra le metodiche di RMN avanzata, la segmentazione cerebrale automatizzata della risonanza magnetica pesata in T1 ha dimostrato nell'atrofia multisistemica specifici pattern di perdita di volume a carico di putamen, cervelletto e peduncolo cerebellare medio; questa tecnica di studio volumetrico ha dimostrato un'elevata accuratezza nel differenziare l'MSA dal PD. (51)

Infine, gli approcci di imaging multimodale, il cui uso è ancora limitato a centri di ricerca specializzati, hanno dimostrato risultati promettenti: l'associazione della valutazione dei tempi di rilassamento T2\* e della diffusività media nel putamen ha

dimostrato un'accuratezza diagnostica del 96% nel discriminare i pazienti affetti da MSA-P da quelli con malattia di Parkinson. (52)

#### b. Scintigrafia cerebrale con DaT-scan

La tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo (SPECT) del trasportatore della dopamina (anche noto come DaTscan) permette di rilevare una disfunzione neuronale dopaminergica presinaptica, che si esprime con una ridotta captazione del tracciante radioattivo nei gangli della base. Nonostante l'alta sensibilità e specificità nell'identificare la denervazione dopaminergica dello striato, questo esame non consente di fare diagnosi differenziale tra MSA e PD. (26)

#### c. [18F] FDG-PET

L'utilità della [18F] FDG-PET nella diagnosi differenziale delle  $\alpha$ -sinucleinopatie è da ricondurre all'elevata specificità, superiore al 90%, della metodica per la diagnosi di atrofia multisistemica. Aspetto tipico di questa patologia è l'ipometabolismo del glucosio cerebellare, del tronco encefalico e putaminale. (53)

### **1.4.2 Nuovi biomarcatori**

La malattia di Parkinson e l'atrofia multisistemica sono caratterizzate da una fase prodromica, che può anticipare anche di molti anni la comparsa dei sintomi motori. La ricerca si è concentrata sull'individuazione di biomarcatori su liquor, sangue e cute, che, riflettendo la fisiopatologia di queste patologie, sono potenzialmente in grado di identificare i cambiamenti neurobiologici associati alla malattia, anche nel paziente asintomatico o paucisintomatico. (54) La diagnosi della malattia in una fase precoce è fondamentale in modo da avere un'ampia finestra in cui poter utilizzare, con il massimo effetto terapeutico, le terapie *disease modifying* in fase di studio.

#### a. Plasma

Grazie alla maggiore accessibilità rispetto al liquido cefalorachidiano, il plasma è un fluido biologico in cui è stata indagata la presenza di biomarcatori di  $\alpha$ -sinucleinopatie, in particolare di neurofilamenti a catena leggera, che sono in grado di attraversare in piccole quantità la barriera ematoencefalica. Nell'atrofia

multisistemica, essendo la degenerazione assonale un fenomeno prevalentemente centrale, le concentrazioni plasmatiche sono molto inferiori rispetto a quelle presenti nel liquor, richiedendo metodiche ad alta sensibilità per la loro rilevazione. Inoltre, questo parametro sembrerebbe essere soggetto a importante variabilità, correlata alla permeabilità della barriera stessa e ai possibili eventuali danni dei tessuti molli, che possono determinare lesioni nervose a livello periferico. (55) Uno studio condotto da Singer W. et al. ha evidenziato una correlazione moderata tra i valori del neurofilamento a catena leggera nel liquido cefalorachidiano e nel plasma. La capacità di differenziare i disordini a corpi di Lewy dall'atrofia multisistemica è mantenuta, con accuratezza diagnostica inferiore rispetto al dosaggio nel liquor (56).

L' $\alpha$ -sinucleina è presente nel sangue, ma la sua fonte principale è rappresentata dai globuli rossi. La sua concentrazione è, quindi, fortemente influenzata dall'emolisi e dalla contaminazione da parte degli eritrociti. (54) Mentre la misurazione dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina totale nel siero e nel plasma ha condotto a risultati contrastanti (54), nei pazienti affetti da malattia di Parkinson si sono rilevate concentrazioni aumentate sia di  $\alpha$ -sinucleina oligomerica nel siero (57) e nei globuli rossi (58) sia di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata nel plasma rispetto ai controlli (59).

#### b. Liquido cefalo-rachidiano

Il liquor rappresenta la fonte ideale in cui ricercare marcatori diagnostici dei processi patologici a carico del SNC, considerata la sua vicinanza a queste strutture. (54).

Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, i livelli di  $\alpha$ -sinucleina totale nel liquor sono risultati inferiori rispetto alla norma, probabilmente come conseguenza dell'aggregazione della stessa. Da numerose metanalisi nei pazienti affetti da malattia di Parkinson, è, però, emerso che l' $\alpha$ -sinucleina totale nel liquido cerebrospinale, pur essendo inferiore rispetto ai controlli, ha un'accuratezza diagnostica insoddisfacente nel discriminare le due condizioni. (54, 60, 61)

Nei soggetti con malattia di Parkinson, sono state osservate concentrazioni di  $\alpha$ -sinucleina oligomerica e di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata in posizione 129

costantemente aumentate rispetto ai controlli, ma anche in questi casi l'accuratezza diagnostica si è dimostrata subottimale. (60) Pertanto, le specie di  $\alpha$ -sinucleina totale, oligomerica e fosforilata non sembrano essere marcatori diagnostici affidabili, ma la combinazione tra loro e altri *markers* di neurodegenerazione, potrebbe fornire risultati promettenti.

Al fine di rilevare e quantificare gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina presenti nel liquido cefalorachidiano, è possibile usare test di aggregazione come PMCA e RT-QuIC. (62) La *Protein-Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) e la *Real-Time Quaking-Induced Conversion* (RT-QuIC) sono tecniche di amplificazione che consentono di rilevare aggregati patologici di proteine *misfolded*, usate inizialmente nelle malattie da prioni. In una soluzione tampone contenente il substrato, il campione viene incubato e la polimerizzazione inizia a spese delle proteine monomeriche su un template costituito da aggregati proteici preformati. Per aumentare i punti di polimerizzazione, viene indotta la frammentazione degli aggregati formati. Si susseguono cicli di incubazione e frammentazione, al fine di amplificare in modo esponenziale gli aggregati. Per rilevare la loro presenza, viene registrata la fluorescenza del colorante ThT, che viene potenziata dal legame agli aggregati ed è proporzionale alla loro quantità. (62) In uno studio del 2018 condotto da Groveman et al., l'uso della tecnica RT-QuIC su campioni di liquor ha mostrato risposte positive nel 93% dei pazienti affetti da malattia di Parkinson e demenza a corpi di Lewy e in nessuno dei soggetti di controllo (sani o affetti da malattia di Alzheimer), con una specificità del 100%. (63) In linea con evidenze precedenti, questi risultati suggeriscono che la misurazione degli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina nel liquor è un promettente marcatore diagnostico di  $\alpha$ -sinucleinopatia, che potrebbe essere sfruttato anche per la diagnosi precoce, essendo l'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina uno degli iniziali eventi chiave nella patogenesi di queste malattie. (54)

La catena leggera del neurofilamento (NfL) è un marcatore di degenerazione o lesione assonale della sostanza bianca, essendo i neurofilamenti abbondanti a livello dei grandi assoni mielinizzati. Il dosaggio della proteina può essere facilmente eseguito tramite tecnologia ELISA, un saggio immunologico che permette la misurazione di un analita, solitamente mediante una coppia di anticorpi (*ELISA a sandwich*). Il legame di entrambi gli anticorpi all'analita genera un segnale

colorimetrico o fluorescente, la cui quantificazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita. (64). Aumenti della catena leggera del neurofilamento sono stati rilevati in una serie di condizioni quali traumi, patologie neurodegenerative a rapida progressione e malattie neuroinfiammatorie a elevata attività di malattia. (65) È stato dimostrato che il dosaggio della catena leggera del neurofilamento su campioni di liquor consente di distinguere i pazienti affetti da  $\alpha$ -sinucleinopatie a corpi di Lewy (malattia di Parkinson e demenza a corpi di Lewy) da quelli con atrofia multisistemica, con sensibilità dell'89% e specificità del 93%; i livelli di questo marcatore sono significativamente più elevati nell'MSA, coerentemente con le scoperte patogenetiche, pur non essendo specifici della malattia. (55, 66, 67)

### c. Cute

Con l'obiettivo di usare l' $\alpha$ -sinucleina come marcatore in vivo, rilevandone i depositi anomali al di fuori del SNC, sono stati indagati diversi campioni di tessuto periferico, tra cui il tratto gastrointestinale, le ghiandole salivari minori, le ghiandole sottomandibolari e la cute. Tra questi, la ricerca dei depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata mediante immunoistochimica ha dimostrato la miglior accuratezza diagnostica nei campioni di cute. (68)

Uno studio pubblicato nel 2024 da Gibbons et al., basato su un campione di 428 pazienti affetti da  $\alpha$ -sinucleinopatie (malattia di Parkinson, Demenza a corpi di Lewy, insufficienza autonoma pura e atrofia multisistemica) ha mostrato che in più del 92% dei pazienti sono presenti depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata a livello cutaneo. In linea con evidenze precedenti, è stata dimostrata una correlazione tra la valutazione quantitativa e la severità della malattia. (69)

Ulteriori indagini, volte a individuare elementi utili alla diagnosi differenziale tra MSA e PD, hanno evidenziato differenze nella localizzazione periferica dei depositi della proteina tra le due patologie: nell'MSA, sono coinvolte principalmente le fibre nervose somatiche del plesso subepidermico mentre nelle altre  $\alpha$ -sinucleinopatie sono le fibre nervose autonome ad essere maggiormente interessate. (70,71,72) Questo è coerente con il coinvolgimento principalmente preganglionico nell'atrofia

multisistemica e postganglionico nelle altre patologie, alla base della disfunzione autonoma.

In uno studio condotto nel 2023 da Gibbons et al., si è osservata anche una differenza topografica nei depositi di  $\alpha$ -sinucleina: mentre nei pazienti con MSA la distribuzione sembrava più uniforme, nei pazienti affetti da malattia di Parkinson si è osservato un gradiente prossimale-distale nei campioni, con il sito cervicale posteriore positivo nel 93% dei casi, la coscia prossimale positiva nel 33% dei casi e la coscia distale nel 17% dei casi. Inoltre, nei pazienti con MSA la deposizione cutanea di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata era maggiore rispetto ai pazienti affetti da PD. (70)

Anche la ricerca di  $\alpha$ -sinucleina tramite *seed amplification assays* (RT-QuIC) si è dimostrata utile nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e controlli sani con un'accuratezza diagnostica dell'88.9%. Inoltre, è stata dimostrata una correlazione dell'attività di *seeding* dell' $\alpha$ -sinucleina nel test di RT-QuIC con la durata e lo stadio della malattia, con livelli maggiori di attività che sembrano essere associati a sintomi non motori quali RBD, compromissione cognitiva e stipsi. (73)

Queste evidenze supportano la biopsia di cute come metodo accurato per distinguere tra atrofia multisistemica e malattia di Parkinson, oltre a confermare la diagnosi di  $\alpha$ -sinucleinopatia.

#### d. Tratto gastrointestinale e ghiandole salivari

Oltre alla cute, altri tessuti sono stati usati come substrato per la ricerca in vivo di depositi di  $\alpha$ -sinucleina, tra cui il tratto gastrointestinale, le ghiandole sottomandibolari e le ghiandole salivari minori.

Per quanto riguarda il tratto gastrointestinale, l'immunoreattività dell' $\alpha$ -sinucleina all'interno del sistema nervoso autonomo enterico è stata evidenziata in vivo per la prima volta nei pazienti con malattia di Parkinson nel 2008 da Leboviev et al. su preparati chirurgici del colon comprendenti la sottomucosa. (74) L'uso di campioni biotici più sottili inclusi in paraffina ha condotto a risultati contrastanti nei diversi studi. (75,76,77) La sensibilità è limitata dalle dimensioni ridotte dell'area biopsiata e dal fatto che spesso nei campioni non sono inclusi i plessi mioenterici e

sottomucosi, sedi principali dei depositi di  $\alpha$ -sinucleina negli studi autoptici. Inoltre, la fisiologica espressione di  $\alpha$ -sinucleina nel tratto gastrointestinale limita anche la specificità di questa metodica, che può essere migliorata dall'uso dell'anticorpo anti- $\alpha$ -sinucleina fosforilata e dall'uso simultaneo di marcatori per confermare la localizzazione neuronale. (68)

Considerata la presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina nelle ghiandole sottomandibolari negli studi autoptici nei pazienti con malattia di Parkinson, si è indagato anche questo tessuto come substrato per la ricerca di depositi patologici in vivo. Gli studi hanno però evidenziato una sensibilità ridotta, oltre a un elevato tasso di errori durante la procedura biptica e l'elevata incidenza di eventi avversi. (68)

## **1.5 Disfunzione autonoma nelle $\alpha$ -sinucleinopatie**

La disfunzione del sistema nervoso autonomo è una caratteristica comune nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie. Le diverse entità cliniche presentano peculiarità nella frequenza, nel pattern e nella severità delle manifestazioni disautonomiche, come risultato di un coinvolgimento variabile delle strutture del sistema nervoso autonomo centrale e periferico. (1)

L'insufficienza autonoma pura è causata da un danno postgangliare efferente del sistema autonomo, con conseguente disfunzione dei nervi simpatici periferici e compromissione della produzione e del rilascio di catecolamine. (78)

Nella malattia di Parkinson e nella demenza a corpi di Lewy, i depositi di  $\alpha$ -sinucleina si ritrovano principalmente a livello delle strutture postgangliari periferiche del sistema nervoso autonomo, anche se talvolta si può riscontrare un coinvolgimento centrale.

Nell'atrofia multisistemica, la disfunzione autonoma è dovuta al danno a carico dei neuroni autonomi pregangliari nel tronco encefalico e nel midollo spinale. Anche in circa il 30% dei pazienti con MSA si è osservato un coinvolgimento del sistema nervoso autonomo periferico, che tende a presentarsi con la progressione della malattia. (78)



La disfunzione autonoma può coinvolgere i sistemi cardiovascolare, termoregolatorio, urogenitale e gastrointestinale.

### **1.5.1 Disfunzione autonoma cardiovascolare**

La manifestazione clinica principale della disfunzione autonoma cardiovascolare è l'ipotensione ortostatica (OH). Clinicamente, l'ipotensione ortostatica è definita come una diminuzione sostenuta della pressione arteriosa sistolica di almeno 20 mmHg o della pressione arteriosa diastolica di almeno 10 mmHg, entro i primi 3 minuti dall'assunzione della stazione eretta. (79, 80)

Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, l'ipotensione ortostatica è spesso ritardata (*delayed OH*), con possibile caduta della pressione arteriosa anche dopo più di tre minuti dal passaggio all'ortostatismo. (81)

L'ipotensione ortostatica può essere asintomatica o manifestarsi con sintomi di ipoperfusione d'organo quali offuscamento della vista, dispnea, rallentamento della performance cognitiva, astenia, vertigini, fino alla vera e propria perdita di coscienza. Tutti questi sintomi sono scatenati dall'assunzione della posizione ortostatica e regrediscono prontamente al raggiungimento del clinostatismo. (82)

Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, l'ipotensione ortostatica è secondaria a insufficiente vasocostrizione e inadeguato compenso da parte della frequenza cardiaca, dovuti a un'alterazione dei riflessi barocettivi e, in particolare, alla compromissione dell'attivazione dei neuroni simpatici e, di conseguenza, del rilascio di noradrenalina. La causa può essere un danno a carico dei neuroni simpatici postgangliari periferici, come si verifica principalmente nella malattia di Parkinson e nella demenza a corpi di Lewy, o dei neuroni pregangliari e premotori nel midollo spinale e nel tronco cerebrale, come nell'atrofia multisistemica; nel secondo caso, ad essere compromesse sono le connessioni tra il nucleo del tratto solitario e i nuclei ipotalamici che regolano il rilascio di vasopressina. (82)

Quando l'ipotensione ortostatica è dovuta a una compromissione nell'attivazione dei neuroni simpatici vasocostrittori, come avviene nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, si parla di OH neurogena. La valutazione dell'aumento della frequenza cardiaca

all'assunzione della posizione eretta consente di distinguere l'ipotensione ortostatica non neurogena da quella neurogena: nel primo caso, si ha una marcata tachicardia mentre, nel secondo caso, l'aumento della frequenza cardiaca è minimo o assente. (83)

In linea con altre precedenti indagini, un recente studio (83) ha dimostrato che, all'assunzione della posizione eretta, la frequenza cardiaca va incontro ad un aumento maggiore nei pazienti con disfunzione autonoma centrale (MSA) rispetto a quelli con disfunzione periferica (PD).

Nella malattia di Parkinson, la frequenza dell'ipotensione ortostatica aumenta con la progressione della malattia, dal 14% nei pazienti in fase iniziale al 52% negli stadi successivi e negli individui più anziani; nella demenza a corpi di Lewy, è riportata in circa il 68% dei pazienti. (84) L'ipotensione ortostatica nell'atrofia multisistemica ha una prevalenza stimata intorno al 75% e tende a manifestarsi più precocemente rispetto ai disordini a corpi di Lewy. (85, 86)

Nel 50% dei pazienti con compromissione del sistema simpatico può essere presente anche ipertensione supina, definita come pressione arteriosa >140/90 mmHg in clinostatismo, causata verosimilmente dall'attivazione delle fibre simpatiche residue e dalla sovra-sensibilità secondaria alla denervazione. (75, 87)

#### Accertamenti diagnostici per lo studio della funzione autonoma cardiovascolare

La funzione vagale viene studiata valutando l'andamento della frequenza cardiaca durante la manovra di Valsalva e la respirazione profonda. Le variazioni della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca durante la manovra di Valsalva e l'*head up tilt test* permettono di valutare la funzione adrenergica. (88)

##### ➤ Manovra di Valsalva

La manovra di Valsalva consente di valutare l'intero arco baroriflesso, cioè sia la funzione vagale sia quella adrenergica. Questo test consiste nel valutare la variazione della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa mentre il soggetto espira forzatamente contro una resistenza. Osservando il cambiamento della pressione arteriosa, sono state distinte quattro fasi: (88,89)

- Fase I. Nel momento in cui la persona inizia a espirare contro la resistenza, si registra un breve aumento della pressione arteriosa per effetto meccanico, a causa di un aumento improvviso della pressione intratoracica;
- Fase II. Con l'aumento dello sforzo, il ritorno del sangue venoso è ostacolato dal progressivo aumento della pressione intratoracica, comportando una riduzione del riempimento cardiaco, un calo della gittata sistolica e, di conseguenza, della pressione arteriosa sistemica. Questi cambiamenti liberano il sistema simpatico noradrenergico dall'inibizione da parte dei barocettori, con conseguente rilascio di noradrenalina che determina vasocostrizione e, verso la fine della fase II, un aumento della pressione arteriosa;
- Fase III. Quando il soggetto si rilassa, la pressione intratoracica ritorna al *baseline* e la pressione sanguigna diminuisce, per effetto meccanico (come nella fase I).
- Fase IV. In assenza di un ostacolo al ritorno venoso al cuore, il riempimento cardiaco aumenta così come la gittata sistolica ma c'è ancora vasocostrizione; la conseguenza è un rapido aumento della pressione, superando il *baseline*. Questo determina lo stimolo del riflesso barocettivo arterioso, con un'inibizione degli afflussi simpatici e una diminuzione della pressione sanguigna al *baseline*.

Per quanto riguarda le variazioni della frequenza cardiaca, nella fase II, con il progressivo abbassamento della pressione al di sotto del *baseline*, si verifica un aumento riflesso della frequenza cardiaca, a causa della riduzione dell'afflusso parasimpatico vagale. L'aumento eccessivo della frequenza cardiaca durante la fase II è impedito dall'atropina, che blocca i recettori muscarinici colinergici.

La disfunzione del sistema simpatico si manifesta con un progressivo calo della pressione arteriosa durante la fase II e un ritorno lento della pressione verso il *baseline* nella fase IV, con assenza dell'*overshoot* pressorio nella fase IV.

La disfunzione del sistema parasimpatico si rileva come una riduzione del *Valsalva ratio*, che corrisponde al rapporto tra la frequenza cardiaca più alta generata durante

manovra di Valsalva e la frequenza cardiaca più bassa rilevata entro 30 secondi dalla frequenza cardiaca massima. (88)

Questi segni di compromissione del sistema nervoso simpatico e parasimpatico si presentano più frequentemente nell'atrofia multisistemica rispetto alla malattia di Parkinson. (48)

➤ *Head up tilt test*

L'*Head up tilt test* permette di valutare la risposta della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca all'ortostatismo passivo, indagando la presenza di ipotensione ortostatica. In condizioni normali, si registra un modesto aumento della frequenza cardiaca, pari a 5-20 bpm, mentre la pressione arteriosa rimane pressoché stabile, con un calo della pressione arteriosa sistolica inferiore a 10 mmHg. Nell'ipotensione ortostatica neurogena, si registra un'importante caduta della pressione arteriosa mentre la risposta della frequenza cardiaca è ridotta o assente. (88)

Nei pazienti con atrofia multisistemica, tipicamente l'*head up tilt test* rileva un'ipotensione ortostatica più severa e più frequentemente associata all'ipertensione supina rispetto a quanto viene registrato nei soggetti con malattia di Parkinson. (48)

➤ *Analisi spettrale della variabilità della frequenza cardiaca*

Le tecniche di analisi spettrale forniscono una misura quantitativa della variabilità della frequenza cardiaca (HRV). In base alla loro frequenza, le oscillazioni della frequenza cardiaca sono divise in quattro bande: bande di ultra-bassa frequenza (ULF), molto bassa frequenza (VLF), bassa frequenza (LF) e alta frequenza (HF). Le tecniche di analisi spettrale stimano la distribuzione della potenza assoluta o relativa nelle quattro bande di frequenza. La potenza della banda a bassa frequenza (LF), con frequenza compresa tra 0.04 e 0.15 Hz, si ritiene essere influenzata dall'attività del sistema nervoso simpatico ma anche del parasimpatico e dei barocettori. La potenza della banda ad alta frequenza (HF), con frequenza compresa tra 0.15 e 0.40 Hz, riflette l'attività parasimpatica e include le variazioni legate al ciclo respiratorio. Pertanto, la valutazione della potenza associata a ciascuna banda

consente di indagare la funzionalità delle due componenti del sistema nervoso autonomo; il rapporto tra le potenze LF/HF esprime un predominio parasimpatico quando ridotto e un predominio simpatico se aumentato. (90)

➤ Monitoraggio continuo della pressione arteriosa 24 h

Il monitoraggio continuo della pressione arteriosa delle 24 h (Holter pressorio 24h) consente di registrare la pressione arteriosa sistolica, la pressione arteriosa diastolica e la frequenza cardiaca durante le attività quotidiane normali diurne e il riposo notturno del paziente. Questo esame può rilevare alcune manifestazioni della disfunzione autonoma cardiovascolare, quali l'ipotensione post-prandiale, l'ipertensione supina e le alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa fino all'ipertensione notturna.

Le alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa hanno un comportamento simile nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, senza un profilo specifico di malattia tale da discriminare l'atrofia multisistemica dalla malattia di Parkinson. La valutazione dell'andamento circadiano della frequenza cardiaca in pazienti affetti da atrofia multisistemica e malattia di Parkinson, ha mostrato profili distinti: i pazienti con MSA hanno mostrato una frequenza cardiaca notturna maggiore e un calo notturno della frequenza cardiaca significativamente inferiore. Questi parametri hanno permesso di discriminare i pazienti con MSA dai pazienti con PD con un'accuratezza diagnostica accettabile, suggerendo una possibile utilità del monitoraggio pressorio delle 24h nella diagnosi differenziale tra malattia di Parkinson e atrofia multisistemica, anche alla luce della sua ampia disponibilità e del suo basso costo. (91)

➤ Misurazione dei livelli di catecolamine plasmatiche

La misurazione dei livelli di adrenalina plasmatica in posizione supina e dopo un periodo di stazione eretta fornisce un altro metodo per studiare la funzione adrenergica. In condizioni di normalità, i livelli plasmatici raddoppiano dopo l'assunzione dell'ortostatismo. In caso di insufficienza adrenergica post-gangliare, come nell'insufficienza autonoma pura (PAF) e nella malattia di Parkinson, in posizione supina i livelli di catecolamine sono inferiori alla norma. Nell'atrofia

multisistemica, essendo la lesione pregangliare, in clinostatismo i valori sono normali mentre non si rileva l'incremento normalmente associato all'assunzione della stazione eretta. (88) Livelli plasmatici di norepinefrina in posizione supina >100 pg/mL hanno dimostrato buona accuratezza diagnostica nel distinguere l'atrofia multisistemica dall'insufficienza autonoma ma non dalla malattia di Parkinson. (48)

➤ Scintigrafia miocardica con [123I] MIBG

La scintigrafia miocardica con [123I] MIBG permette di studiare l'innervazione simpatica miocardica, in particolare l'integrità funzionale delle fibre nervose, valutando la captazione cardiaca del MIBG, analogo della noradrenalina. In genere, nei disordini a corpi di Lewy, la captazione cardiaca di catecolamine marcate è compromessa, a causa della degenerazione delle fibre simpatiche postgangliari, anche se è talvolta possibile avere una scintigrafia normale in pazienti con malattia di Parkinson allo stadio precoce. Nei pazienti con atrofia multisistemica, essendo l'innervazione simpatica postganglionica cardiaca in genere preservata, la scintigrafia miocardica con [123I] MIBG è tipicamente normale, anche se risulta alterata in circa il 30% dei casi. (48)

### 1.5.2 Alterazioni della termoregolazione

Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, la disfunzione autonoma può frequentemente coinvolgere anche le vie della termoregolazione, manifestandosi con ipoidrosi/anidrosi e intolleranza al caldo oppure sudorazione eccessiva, secondaria a iperidrosi compensatoria.

#### Accertamenti diagnostici

Per valutare la funzione sudomotoria, i test usati sono il test quantitativo dell'assone riflesso sudomotore (QSART) e il test del sudore termoregolatore (TST). (88)

L'evidenza di un'anidrosi più severa, diffusa e progressiva è caratteristica dell'atrofia multisistemica, permettendo di distinguerla dalla malattia di Parkinson con una specificità dall'85% al 100% e dalla demenza a corpi di Lewy con una specificità del 92%. (48)

➤ QSART

Tramite il QSART viene valutata l'integrità funzionale dell'assone sudomotore simpatico postgangliare. Questo test si basa sulla misurazione in quattro siti (avambraccio, gamba prossimale, gamba distale e piede) della risposta sudoripara alla stimolazione con acetilcolina.

➤ TST

Il TST consente di indagare l'integrità delle vie simpatiche dirette dall'ipotalamo alla ghiandola sudoripara eccrina, permettendo di individuare una lesione in diverse sedi; è un test in cui la sudorazione è indotta dal riscaldamento ed è evidenziata dal cambiamento di colore nella polvere indicatrice con cui è cosparsa la superficie corporea del soggetto; viene così valutata la percentuale di anidrosi.

### 1.5.3 Disfunzione autonoma gastrointestinale

Nelle  $\alpha$ -sinucleinopatie, la disfunzione autonoma si può manifestare con disturbi a carico di tutti i tratti dell'apparato gastrointestinale, quali disfagia, sensazione di ripienezza precoce, nausea, vomito, dolori addominali crampiformi, stipsi e diarrea. Tra questi sintomi, il più comune è la stipsi, definita come una frequenza di evacuazione inferiore a tre volte a settimana. La stipsi è riferita da una percentuale di pazienti affetti da malattia di Parkinson compresa tra il 54% e il 90%; nel 48% di questi, il disturbo ha anticipato la comparsa dei sintomi motori, anche di 10 anni. (92) Nella malattia di Parkinson, la stipsi si ritiene essere associata al coinvolgimento diretto dei neuroni del sistema nervoso enterico da parte dei depositi degli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina. (78)

L'interessamento del tratto gastrointestinale superiore, con disfagia, alterazione della motilità esofagea e gastroparesi, ha un impatto maggiore sulla qualità della vita dei pazienti, con potenziale impatto anche sulla sopravvivenza, considerato che la polmonite *ab ingestis* rappresenta una delle più frequenti cause di morte nei pazienti affetti da  $\alpha$ -sinucleinopatie. In genere, la disfagia si manifesta precocemente e con severità maggiore nei pazienti con atrofia multisistemica rispetto a quelli con patologie a corpi di Lewy, in cui è tendenzialmente lieve-moderata e compare nelle fasi avanzate di malattia. (85)

#### 1.5.4 Disfunzione genitourinaria

La disfunzione urinaria è una manifestazione disautonomica frequente e precoce nei pazienti affetti da  $\alpha$ -sinucleinopatie; la percentuale di pazienti con questa disfunzione arriva al 71% nella malattia di Parkinson e al 96% nell'atrofia multisistemica. (85, 93) I pazienti con MSA in fase iniziale tendono a presentare disturbi con grado di severità maggiore rispetto a quelli della PD avanzata. (48)

Nell'atrofia multisistemica, i disturbi del tratto urinario inferiore anticipano nel 60% dei casi i sintomi motori; i sintomi precoci sono l'urgenza e l'aumento della frequenza urinaria, che riflettono l'iperattività del detrusore e spesso evolvono in incontinenza conclamata, entro pochi anni dall'esordio della malattia. Come conseguenza della disfunzione del collo vescicale, della denervazione dello sfintere esterno e dell'ipotonia del detrusore, la ritenzione urinaria, con aumento del residuo post-minzionale, si manifesta nelle fasi avanzate di malattia, anche se può talvolta essere presente precocemente. (94, 95)

I disturbi più comuni nei pazienti con malattia di Parkinson sono nicturia e aumento della frequenza minzionale mentre l'anomalia vescicale più frequentemente riscontrata è l'iperattività del detrusore, con residuo post-minzionale generalmente basso; pertanto, la presenza di ritenzione urinaria indirizza verso la diagnosi di atrofia multisistemica piuttosto che di malattia di Parkinson. (95)

La disfunzione erettile è l'incapacità di raggiungere o mantenere un'erezione peniena sufficientemente lunga per consentire un rapporto sessuale. (96) È il sintomo iniziale nel 48% degli uomini affetti da MSA, arrivando a interessare il 97% dei malati, mentre è riferita da circa il 79% degli uomini con PD. (85, 97)



## **2 Scopo dello studio**

Lo scopo di questo studio è la definizione delle caratteristiche della disfunzione autonoma nella malattia di Parkinson e nell'atrofia multisistemica.

In particolare, l'obiettivo è identificare, tramite valutazione clinica e strumentale standardizzata, gli aspetti che possano supportare la diagnosi differenziale tra le due patologie, con focus sul coinvolgimento del sistema nervoso autonomo urinario e cardiovascolare.

## 3 Materiali e metodi

### 3.1 Popolazione

Sono stati presi in considerazione pazienti con diagnosi di malattia di Parkinson (PD) e atrofia multisistemica (MSA), valutati presso la Clinica Neurologica dell'Università di Padova tra il 2020 e il 2024 e ricoverati in elezione in un'unità operativa semplice che ha iniziato la sua attività a partire da ottobre 2023.

La diagnosi di malattia di Parkinson è stata posta secondo i criteri stabiliti nel 2015 dalla *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS). (13) Essi si basano principalmente sull'esame neurologico clinico con riscontro di un parkinsonismo (sindrome clinica definita da bradicinesia + tremore a riposo e/o rigidità muscolare), associato a criteri di supporto, criteri di esclusione e *red flags*. In un sottogruppo di pazienti, la diagnosi clinica è stata supportata dall'esecuzione di DaT-scan. Criterio di inclusione nel gruppo con PD è stata la presenza di sintomi di disfunzione autonoma.

La diagnosi di atrofia multisistemica (MSA) è stata eseguita secondo i criteri stabiliti nel 2022 dalla *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS). (37) Essi si basano sull'osservazione degli aspetti clinici principali (parkinsonismo, coinvolgimento cerebellare, presenza di disfunzione autonoma), associati a caratteristiche cliniche di supporto e assenza di criteri di esclusione, e possono essere supportati da esami di imaging o di medicina nucleare.

### 3.2 Valutazione clinica

Tutti i pazienti sono stati valutati tramite un esame obiettivo neurologico generale, integrato da scale validate, al fine di avere una stima oggettiva del coinvolgimento motorio e autonomo; un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a valutazione neuropsicologica.

### 3.2.1 Scala MDS-UPDRS

La scala MDS-UPDRS (*Movement Disorder Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) è stata usata per la valutazione della condizione clinica nei pazienti con malattia di Parkinson, permettendo di determinare il grado di severità di malattia e di disabilità globale associata. (98)

Questo strumento è una nuova versione della scala UPDRS del 1987, revisionata in seguito a una critica posta dall'*International Movement Disorder Society* nel 2001; mentre la divisione in quattro parti è stata mantenuta, sono stati aggiunti e ridistribuiti alcuni item e si è modificato il tema principale di ciascuna parte, oltre alla metodologia di acquisizione dei dati.

La scala MDS-UPDRS si compone di quattro parti:

- Parte I, “*Non-motor aspects of experiences of daily living*”, include 13 items, indagati mediante un questionario per pazienti e/o caregiver, che in parte richiede di essere somministrato dall'esaminatore e in parte può essere compilato in autonomia. Questa sezione valuta la presenza di disturbi neuropsichiatrici come compromissione cognitiva, allucinazioni, psicosi e disturbi dell'umore ma anche di disturbi del sonno, sintomi disautonomici, dolore e affaticabilità;
- Parte II, “*Motor aspects of experiences of daily living*”, include 13 items, indagati mediante un questionario che può essere interamente compilato in autonomia da parte del paziente e/o caregiver. Questa sezione valuta la capacità di svolgere azioni della vita quotidiana come parlare, mangiare, vestirsi, provvedere all'igiene personale e camminare;
- Parte III, “*Motor examination*”, consiste nell'esame obiettivo alla ricerca di segni di parkinsonismo, tramite la valutazione di 18 tasks motorie;
- Parte IV, “*Motor complications*”, include 6 items, indagati dall'esaminatore mediante la somministrazione di una serie di domande mirate a valutare l'eventuale presenza di fluttuazioni motorie e discinesie.

Le opzioni di risposta ad ogni domanda sono cinque, da 0 a 4; punteggi crescenti sono associati a un grado crescente di severità, disabilità ed *impairment*.

### 3.2.2 Scala UMSARS

La scala UMSARS è stata usata per la valutazione clinica nei pazienti affetti da atrofia multisistemica. Questo strumento rappresenta la prima scala di valutazione per l'MSA, validata nel 2004, data la mancanza di strumenti specifici per misurare il deterioramento funzionale e l'invalidità associati a questa patologia. (99) Consiste in una scala multimodale, che si compone di quattro parti:

- Parte I, “*Historical review*”, consiste in 12 items che valutano sia la capacità di svolgere azioni motorie della vita quotidiana quali parlare, scrivere, mangiare, vestirsi, provvedere alla propria igiene personale, camminare sia la disfunzione autonoma tra cui sintomi di intolleranza ortostatica, disfunzione genito-urinaria e gastrointestinale. A ogni item viene assegnato un punteggio da 0 a 4;
- Parte II, “*Motor examination scale*”, corrisponde all'esame neurologico, includendo 14 items; a ciascun item può essere assegnato un punteggio da 0 a 4. La maggior parte di questi valuta movimenti complessi, come i movimenti alternati rapidi delle mani e la *leg agility*, mentre solo alcuni si riferiscono direttamente a caratteristiche parkinsoniane (tremore a riposo) o cerebellari (disfunzione oculo-motoria e test tallone-ginocchio);
- Parte III, “*Autonomic examination*”, valuta la presenza di ipotensione ortostatica, misurando la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca dopo due minuti di riposo in posizione supina e dopo due minuti di posizione eretta;
- Parte IV, “*Global disability scale*”, valuta il grado di compromissione e disabilità globale del paziente; può assumere un valore numerico da 1, qualora il paziente sia completamente indipendente, a 5, se il soggetto ha perso completamente la sua autonomia.

Nella scala UMSARS, le caratteristiche cognitive e psichiatriche e le complicanze motorie della terapia non sono presenti in quanto hanno limitata rilevanza nella compromissione associata all'atrofia multisistemica.

### 3.2.3 COMPASS 31

Il COMPASS 31 (*Composite Autonomic Symptom Score 31*) (100) è una scala validata sviluppata per indagare i sintomi di disfunzione autonoma, la loro severità, frequenza e andamento temporale; consiste in un questionario che include 31 domande, raggruppate in sei domini:

- intolleranza ortostatica (4 domande). Si indagano sintomi come debolezza e confusione al passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo;
- dominio vasomotore (3 domande). Si indagano cambiamenti nel colore cutaneo e le aree del corpo affette;
- dominio secretomotore (4 domande). Si indagano alterazioni nella sudorazione, xeroftalmia e xerostomia;
- funzione gastrointestinale (12 domande). Si indagano sensazione di riempimento precoce, vomito, dolore addominale, diarrea e stipsi;
- funzione vescicale (3 domande). Si indagano *urge incontinence* e sensazione di svuotamento incompleto;
- dominio pupillomotore (5 domande). Si indagano sensibilità alla luce intensa e difficoltà nel mettere a fuoco.

Il punteggio totale, il cui minimo è 0 e il massimo è 100, si ottiene sommando i punteggi complessivi di ogni dominio, precedentemente moltiplicati per un fattore di pesatura. Il valore di questo fattore moltiplicativo è diverso per ciascun dominio, riflettendo la diversa rilevanza nella valutazione delle funzioni autonome; ad esempio, il fattore moltiplicativo del dominio "intolleranza ortostatica" è 4 con punteggio massimo associato pari a 40.

### 3.2.4 Valutazione neuropsicologica

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a valutazione neuropsicologica, che ha incluso i test *Mini mental state examination* (MMSE) e *MOntreal Cognitive Assessment* (MOCA).

#### *Mini mental state examination* (MMSE)

Il *Mini mental state examination* (MMSE) è il test di screening più usato per valutare globalmente le funzioni cognitive. Questo strumento indaga l'orientamento spazio-temporale, la memoria, le abilità di calcolo e di attenzione, la capacità di richiamo, di denominazione e di ripetizione, la capacità di eseguire compiti su comando (orale e scritto), la scrittura spontanea e la prassia costruttiva. (101) Sommando i punteggi assegnati a ciascun item, si ottiene il punteggio totale, con un massimo di 30, a cui corrisponde l'assenza di deficit cognitivo, e un minimo di 0, espressione di massimo deficit cognitivo; il punteggio totale può essere corretto in base a fattori come età e scolarità.

#### *MOntreal Cognitive Assessment* (MoCA)

Il *MOntreal Cognitive Assessment* (MoCA) è un test di valutazione di primo livello delle funzioni cognitive, che indaga la presenza di una compromissione cognitiva, eventualmente da approfondire con test specifici per dominio; vantaggi rispetto al MMSE sono una maggiore sensibilità nell'individuare deficit esecutivi e nel diagnosticare il deterioramento cognitivo precoce. (102)

Il MoCA valuta sette domini, tramite prove specifiche: visuo-spaziale/esecutivo, denominazione, attenzione, linguaggio (in particolare la fluenza e la ripetizione), astrazione, memoria (rievocazione differita) e orientamento. Il punteggio grezzo totale del MoCA si ottiene sommando i risultati delle singole prove ed è pari a 30; questo valore viene corretto per età e scolarità, ottenendo il MoCA PC, anch'esso con massimo di 30 punti.

### **3.3 Neuroimaging**

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a PET-RM con [18F] FDG, al fine di valutare l'attività metabolica delle aree dell'encefalo.

Innanzitutto, è stato somministrato per via endovenosa il radiofarmaco, il fluoro-desossiglucosio ([18F] FDG), analogo marcato del glucosio. Dopo un'ora dalla somministrazione del radiofarmaco, sono state ottenute sezioni tomografiche dell'encefalo, in cui si valuta l'attività metabolica delle diverse regioni. La presenza di ipometabolismo è conseguenza di neurodegenerazione dell'area encefalica interessata.

### **3.4 Valutazione autonoma**

#### **3.4.1 Ecografia dell'addome inferiore**

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto all'ecografia dell'addome inferiore con calcolo del residuo post-minzionale, al fine di indagare il tratto urinario inferiore e l'eventuale presenza di una sua disfunzione secondaria a vescica neurogena o ad altre cause; la vescica neurogena è definita come una disfunzione del tratto urinario inferiore causata da un danno neurologico e include l'iperattività del detrusore, la dissinergia detrusore-sfintere e l'ipoattività del detrusore. (103)

L'ecografia transaddominale è stata eseguita con paziente in posizione supina, posizionando la sonda in sede soprapubica per valutare il tratto urinario inferiore. La preparazione ha previsto l'assunzione di almeno un litro d'acqua nell'ora precedente, con lo scopo che la vescica fosse piena al momento dell'esame. Si è valutato l'aspetto degli organi, con particolare attenzione alla struttura della vescica e, nell'uomo, anche al volume della prostata. Immediatamente dopo aver fatto urinare il paziente, l'ecografia transaddominale è stata ripetuta al fine di misurare il residuo post-minzionale (PVR), definito come il volume di urina che rimane in vescica alla fine della minzione.

Il residuo post-minzionale viene valutato in quanto può essere il risultato di un detrusore ipoattivo o atonico, a sua volta possibile conseguenza di un danno a carico del sistema nervoso autonomo. Tra le altre cause di residuo post-minzionale, rientra

l'ostruzione dello sbocco della vescica (BOO), che a sua volta può essere causata da un aumento del volume della prostata, una stenosi uretrale o un incompleto rilassamento dello sfintere; anche l'eventuale presenza di queste condizioni è stata valutata durante l'esame ecografico. (103)

### 3.4.2 Monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 h

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a monitoraggio della pressione arteriosa per 24 h, al fine di valutare l'andamento della pressione arteriosa sistolica (PAS), della pressione arteriosa diastolica (PAD) e della frequenza cardiaca (FC) durante le attività quotidiane diurne e durante il riposo notturno. Questo strumento consente di indagare la presenza di ipotensione ortostatica e di alterazioni nel ritmo circadiano della pressione arteriosa, fino all'ipertensione notturna; fisiologicamente, durante il riposo, si verifica il "*dipping*", ovvero un calo della pressione arteriosa sistolica media tipicamente compreso tra 10% e 20% rispetto al valore medio diurno.

Il monitoraggio è stato eseguito posizionando il manicotto dello sfigmomanometro a livello del braccio non dominante del paziente, connesso ad un sistema di registrazione programmato per rilevare i valori di ciascun parametro ogni 15 minuti durante il giorno e ogni 30 minuti durante la notte.

A partire dalle singole registrazioni, sono stati calcolati i valori medi di PAS, PAD e FC nel periodo diurno, in quello notturno e nelle 24h; per ciascun parametro, i valori medi sono stati utilizzati per calcolare la percentuale di variazione notturna, secondo la formula:  $[(\text{valore diurno} - \text{valore notturno}) / \text{valore diurno}] \times 100$ .

Sulla base della variazione notturna della pressione arteriosa sistolica (PAS), si distinguono tre profili diversi:

- "*dipper*", in caso di diminuzione notturna della PAS uguale o maggiore al 10%;
- "*non-dipper*", qualora la diminuzione notturna della PAS sia <10%;
- "*reverse dipper*", se la PAS aumenta durante il riposo notturno.



### 3.4.3 ECG dinamico secondo Holter 24 h

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a monitoraggio elettrocardiografico dinamico secondo Holter per 24h, per valutare la funzionalità cardiaca. Questo strumento si compone di una serie di elettrodi che vengono fatti aderire al torace del paziente, connessi a un sistema di rilevazione che registra il segnale elettrocardiografico, estrapolato successivamente. Sul tracciato, si è indagata la presenza di anomalie quali aritmie e la presenza di pause.

### 3.4.4 Scintigrafia miocardica con [123I] MIBG

La scintigrafia miocardica con [123I]MIBG è stata eseguita in un sottogruppo di pazienti con lo scopo di indagare l'innervazione simpatica cardiaca; consiste in scansioni SPECT dopo l'iniezione dell'ammina simpaticomimetica 123I-metaiodobenzilguanidina (123I-MIBG).

Innanzitutto, il radiofarmaco 123I-MIBG, analogo dell'ammina simpaticomimetica guanetidina, è stato somministrato per via endovenosa. Il MIBG si lega al trasportatore della noradrenalina (NET), con cui condivide gli stessi meccanismi di assorbimento, immagazzinamento e rilascio. Per rilevare la radioattività derivata dal 123I-MIBG si è utilizzata la tecnica SPECT, non essendo il 123I un isotopo generatore di positroni. Con il paziente in posizione supina, sono state ottenute immagini del torace nella proiezione anteriore, in due momenti temporali successivi: registrazione precoce a 15 minuti e registrazione tardiva a 4 ore dall'iniezione del MIBG.

Per ogni registrazione, l'assorbimento del radiofarmaco è stato quantificato confrontando i conteggi dei pixel nel miocardio, espressione dell'assorbimento di MIBG nel cuore, con quelli nel mediastino, espressione dell'assorbimento di MIBG nel mediastino; pertanto, le concentrazioni miocardiche di radioattività derivata dal 123I-MIBG sono state espresse in termini di rapporti cuore:mediastino (H:M).

La misurazione del rapporto H/M nelle fasi precoci e tardive è il parametro più importante nella valutazione dell'innervazione simpatica del miocardio e una sua eventuale alterazione.

### 3.4.5 Test autonomici cardiovascolari

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a una batteria di test autonomici cardiovascolari, al fine di indagare la funzione del sistema nervoso autonomo e delle sue componenti, il sistema nervoso simpatico e parasimpatico.

#### Manovra di Valsalva

Un sottogruppo di pazienti ha eseguito la manovra di Valsalva con lo scopo di valutare la funzionalità dell'intero arco baroriflesso, cioè sia la funzione vagale sia quella adrenergica.

Il soggetto, in posizione seduta, ha espirato forzatamente per 15 secondi contro una resistenza, costituita da un boccaglio collegato a un manometro. Al termine dello sforzo, il soggetto ha ripreso a respirare regolarmente.

Durante l'esecuzione della manovra sono state monitorate la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca, al fine di valutarne l'andamento.

La manovra si compone di quattro fasi, caratterizzate da una variazione dei valori di pressione arteriosa e frequenza cardiaca:

- Fase I, corrisponde al momento in cui la persona inizia a espirare contro la resistenza. L'aumento improvviso della pressione intratoracica causa un breve aumento della pressione arteriosa per effetto meccanico;
- Fase II, in cui il soggetto continua a espirare, con un aumento progressivo dello sforzo e, di conseguenza, della pressione intratoracica, che ostacola il ritorno venoso al cuore. Si verifica un calo progressivo della pressione arteriosa sistemica, in risposta al quale normalmente si riduce l'afflusso parasimpatico vagale, con un aumento riflesso della frequenza cardiaca, e si attiva il sistema nervoso simpatico noradrenergico, con vasocostrizione e aumento della pressione arteriosa verso la fine della fase II;
- Fase III, segue la fine dell'espirazione e corrisponde al momento in cui il soggetto si rilassa. La pressione intratoracica ritorna al *baseline* e, per effetto meccanico, la pressione arteriosa diminuisce;

- Fase IV. È la fase che segue la fine dell'espiazione, in cui il ritorno venoso al cuore non è più ostacolato, con aumento della gittata sistolica, mentre la vasocostrizione è ancora presente, determinando un rapido aumento della pressione arteriosa oltre il *baseline*, chiamato *overshoot*. In risposta, gli afflussi simpatici sono inibiti e si registra una diminuzione della pressione arteriosa al *baseline*.

Al fine di valutare la funzionalità del sistema nervoso simpatico, si sono considerati parametri qualitativi: l'andamento della pressione arteriosa nella fase II e la presenza dell'*overshoot* pressorio in fase IV.

La funzione del sistema nervoso parasimpatico è stata valutata tramite il *Valsalva ratio*, calcolato come rapporto tra la frequenza cardiaca più alta generata durante manovra di Valsalva (minor intervallo RR) e la frequenza cardiaca più bassa rilevata entro 30 secondi dalla frequenza cardiaca massima (maggior intervallo RR).

#### Deep breathing test

Il test di respirazione profonda è stato eseguito in un sottogruppo di pazienti, al fine di indagare la funzione cardiovagale, tramite la valutazione della variabilità della frequenza cardiaca. Durante la respirazione normale, si verifica l'aritmia sinusale respiratoria (RSA), che corrisponde alla variazione della frequenza cardiaca in sincronia con il ciclo respiratorio, come conseguenza del controllo del sistema nervoso parasimpatico (tramite il nervo vago) sulla frequenza di scarica del nodo senoatriale; durante l'inspirazione, l'attività parasimpatica è quasi abolita e si registra un accorciamento dell'intervallo RR sul tracciato elettrocardiografico mentre, durante l'espiazione, l'attività vagale è massima, con un intervallo RR di ampiezza maggiore. La respirazione profonda (DBT) consente di aumentare il segnale parasimpatico nel controllo dell'aritmia sinusale respiratoria. (104, 105, 106)

Il soggetto, in posizione supina, è stato fatto respirare profondamente per sei volte in un minuto, impiegando 5 secondi per inspirare e 5 secondi per espire, guidato

dalle istruzioni dell'operatore; tramite il monitoraggio elettrocardiografico, sono stati registrati i valori della frequenza cardiaca.

Come indice della variabilità della frequenza cardiaca influenzata dal sistema parasimpatico è stato calcolato l'*Expiration/Inspiration ratio* (E/I) che consiste nel rapporto tra l'intervallo RR più lungo durante l'espirazione e quello più corto durante l'inspirazione. (104)

#### Analisi spettrale della variabilità della frequenza cardiaca (HRV)

L'analisi spettrale della variabilità della frequenza cardiaca è stata eseguita in un sottogruppo di pazienti, al fine di avere una valutazione quantitativa della variabilità della frequenza cardiaca (HRV), che consiste nella fluttuazione degli intervalli di tempo che intercorrono tra battiti cardiaci successivi. La frequenza cardiaca è soggetta a cambiamenti, che possono avvenire con diversa frequenza; si distinguono quattro bande di frequenza in cui si distribuiscono le oscillazioni della frequenza cardiaca: *ultra-low* (ULF), *very low* (VLF), *low* (LF) e *high* (HF).

Innanzitutto, il soggetto è stato sottoposto a monitoraggio elettrocardiografico continuo sia in clinostatismo sia in ortostatismo, rispettivamente per 10 e 5 minuti; nel segnale elettrocardiografico, l'intervallo di tempo tra un battito cardiaco e il successivo corrisponde all'intervallo RR. Dal tracciato elettrocardiografico, si è ottenuto il tacogramma, rappresentazione grafica del cambiamento della durata dell'intervallo RR (in ms) in funzione del tempo (in s).

A partire dal tacogramma, si è calcolata la stima dello spettro di potenza, che descrive la distribuzione della potenza in funzione della frequenza, applicando due algoritmi matematici, la trasformata di Fourier rapida e l'approccio autoregressivo.

Lo spettro calcolato dalla registrazione a breve termine eseguita consente di distinguere tre componenti spettrali principali: componenti *very low* (VLF), *low* (LF) e *high* (HF).

La distribuzione della potenza di LF e HF varia in relazione all'attività del sistema nervoso autonomo. La potenza della banda LF (frequenza compresa tra 0,04–0,15 Hz) si ritiene essere determinata dall'attività del sistema nervoso simpatico, ma anche del parasimpatico e dell'attività dei barocettori. La banda HF o respiratoria

(frequenza compresa tra 0,15–0,40 Hz) riflette l'attività parasimpatica e corrisponde alle variazioni della frequenza cardiaca legate al ciclo respiratorio.

Il rapporto tra potenza di LF e HF (rapporto LF/HF) ha lo scopo di stimare il rapporto tra l'attività del sistema nervoso simpatico e del sistema nervoso parasimpatico.

La banda VLF ha un processo fisiologico responsabile poco definito e rappresenta una misura di dubbio significato nelle registrazioni a breve termine come quella eseguita; pertanto, non è stata considerata tra i parametri studiati.

### Head up tilt test

L'*Head up tilt test* è stato eseguito da un sottogruppo di pazienti, per valutare la risposta della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca ai cambiamenti di posizione e all'ortostatismo passivo.

Il test è stato eseguito in una stanza a temperatura confortevole e priva di rumori in soggetti a digiuno da almeno due ore, al fine di ridurre i fattori potenzialmente in grado di influenzarne i risultati. Dopo un primo periodo di riposo in clinostatismo della durata di 10 minuti, i soggetti sono stati inclinati passivamente fino a 60° per altri 10 minuti; successivamente, è stata raggiunta nuovamente la posizione supina di partenza. Durante l'intera manovra, i pazienti sono stati sottoposti a monitoraggio continuo non invasivo della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, al fine di registrare i valori di questi parametri e valutare l'andamento polso/pressione.

Lo scopo del test è stato indagare la funzione autonoma cardiovascolare, precisamente quella adrenergica, e rilevare l'eventuale presenza di disfunzioni, tra cui l'ipotensione ortostatica.

In condizioni normali, nel passaggio all'ortostatismo passivo, la pressione arteriosa viene mantenuta pressoché stabile mentre la frequenza cardiaca aumenta, grazie all'attivazione del sistema nervoso simpatico. Si parla di ipotensione ortostatica in caso di riscontro di una diminuzione sostenuta della pressione arteriosa sistolica di almeno 20 mmHg o della pressione arteriosa diastolica di almeno 10 mmHg, entro i primi 3 minuti dall'ortostatismo passivo. (79, 80)

### 3.5 Biopsia di cute

Un sottogruppo di pazienti è stato sottoposto a biopsia di cute, al fine di ricercare i depositi di  $\alpha$ -sinucleina.

Dopo l'anestesia locale tramite lidocaina, sono state eseguite quattro biopsie di cute mediante un punch di 3 mm; per quanto riguarda i siti di prelievo, due di queste sono state eseguite nella regione cervicale dorsale tra C7 e C8 mentre le altre due a livello della gamba distale, superiormente al malleolo.

I campioni di cute sono stati sottoposti ad immunistochemica per la ricerca dell' $\alpha$ -sinucleina fosforilata.

#### 3.5.1 Immunistochemica

Le biopsie sono state fissate per 24-48 ore a 4°C in soluzione Zamboni, incorporati in paraffina e sezionati come sezioni spesse 5 $\mu$ m al microtomo (Leica RM2155). È stata utilizzata la colorazione con ematossilina ed eosina per la valutazione istopatologica di routine. La colorazione con immunoperossidasi è stata eseguita su un Autostainer Dako EnVision (Dako Denmark A/S, Glostrup, Danimarca) secondo le raccomandazioni del produttore. Anticorpi per  $\alpha$ -sinucleina fosforilata Ser129 (monoclonal rabbit, diluizione 1:1000, XXX),  $\alpha$ Syn aggregato (Monoclonal Mouse, Clone 5G4, diluizione 1:20.000, Millipore) e PGP9.5 (Polyclonal Rabbit, diluizione 1:300, Abcam; Monoclonal Mouse, diluizione 1:1000, Thermo-Fisher) sono stati utilizzati per la colorazione con immunoperossidasi e per l'immunofluorescenza. L'*antigen retrieval* è stato eseguito su un PT-Link che utilizza tampone citrato a pH 6 a 96° per 15 minuti, seguito da 1 minuto di acido formico al 95% per  $\alpha$ Syn-5G4 anticorpo. rescente è stata eseguita manualmente. Le sezioni sono state trattate con permeabilizzazione e soluzione bloccante (15% vol/vol siero di capra, 2% peso/vol BSA, 0,25% gelatina in peso/vol, glicina 0,2% in peso/vol in PBS) contenente 0,5% di Triton X100 per 90 minuti prima dell'incubazione degli anticorpi primari. Gli anticorpi primari sono stati diluiti in una soluzione bloccante e incubati a 4°C durante la notte. Gli anticorpi secondari Alexa-Fluor plus 488 goat anti-mouse (A32723, Thermo Fisher Scientific) e Alexa-

Fluor anti-Rabbit 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific) sono stati diluiti 1:200 in soluzione bloccante e incubati per 60 minuti a temperatura ambiente. Hoechst 33258 sono stati utilizzati per la colorazione nucleare (Invitrogen, diluizione: 1:10000 in PBS) per 10 minuti. I vetrini sono stati montati e coperti con la soluzione Mowiol (Novabiochem). Immagini z-stack di immunofluorescenza confocale sono state acquisite su un microscopio confocale a scansione laser Leica SP5 utilizzando obiettivi HC PL FLUOTAR 20x/0,50 Secco o HCX PL APO lambda blu 40X/1,40 Olio. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione di intensità di 16 bit in  $2048 \times 2048$  pixel. Le immagini z-stack sono state elaborate e analizzate utilizzando il software ImageJ.

### **3.6 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita usando il software Jamovi.

Le differenze tra i due gruppi di pazienti (PD e MSA) tra le variabili continue sono state valutate mediante l'uso del test t di Student, qualora fossero verificate le ipotesi di normalità della distribuzione (valutata tramite il test di Shapiro-Wilk) e omogeneità delle varianze (valutata tramite il test di Levene). Nel caso di variabili continue per cui non era rispettata l'ipotesi di normalità si è applicato un test non parametrico, U di Mann-Whitney. Nel caso di variabili continue per cui non era rispettata l'ipotesi di omogeneità delle varianze è stato usato il test di Welch. Le differenze tra le variabili categoriche tra le due coorti sono state indagate tramite test  $\chi^2$ .

La differenza è stata considerata statisticamente significativa quando il *p value* è < 0.05.

La presenza di correlazioni tra le variabili è stata indagata tramite il coefficiente di correlazione (r) di Pearson.

## 4 Risultati

### 4.1 Caratteristiche demografiche della popolazione di studio

Lo studio ha coinvolto 24 pazienti, di cui 15 femmine (62.5%) e 9 maschi (37.5%). I pazienti affetti da malattia di Parkinson (PD) con disfunzione autonoma inclusi nello studio sono 8 mentre i pazienti con diagnosi di atrofia multisistemica (MSA) sono 16.

I pazienti affetti da malattia di Parkinson (PD) con disfunzione autonoma sono 5 femmine (62.5%) e 3 maschi (37.5%) con età media di  $69.40 \pm 9.05$  anni. La durata media di malattia è di  $3.63 \pm 2.45$  anni.

La coorte di pazienti con atrofia multisistemica (MSA) ha incluso 10 femmine (62.5%) e 6 maschi (37.5%), con età media di  $61.10 \pm 6.43$  anni. La durata media di malattia è di  $3.88 \pm 1.96$  anni.

Considerando l'età media, è stata documentata una differenza statisticamente significativa tra le due coorti di pazienti ( $p$  value = 0.017). (Tabella I): i pazienti affetti da atrofia multisistemica sono più giovani rispetto ai soggetti con malattia di Parkinson. Non c'è invece differenza statisticamente significativa nella durata di malattia (Tabella I) e nella distribuzione del genere tra i due gruppi. (Tabella II)

	PD (8)		MSA (16)		T di student ( $p$ value)
	Media	DS	Media	DS	
Età (anni)	69.40	9.05	61.10	6.43	<b>0.017</b>
Durata di malattia (anni)	3.63	2.45	3.88	1.96	0.789

**Tabella I** – Età e durata di malattia della popolazione. Differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA. DS=deviazione standard.

Genere	PD (8)		MSA (16)		Test $\chi^2$ ( $p$ value)
	F	M	F	M	
Frequenza	5 (62.5%)	3 (37.5%)	10 (62.5%)	6 (37.5%)	1.000

**Tabella II** – Distribuzione del genere nella popolazione. Differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA. F = femmine; M = maschi.



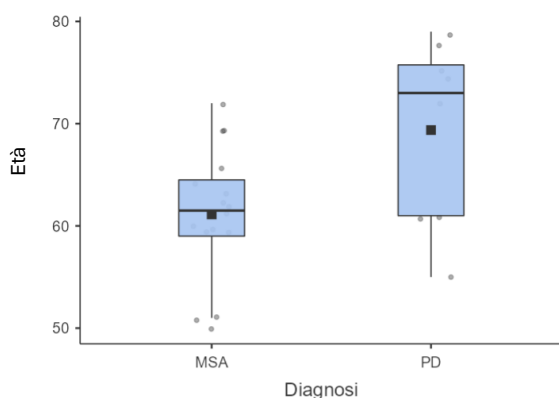


Figura 5. Età nel gruppo MSA e nel gruppo PD.

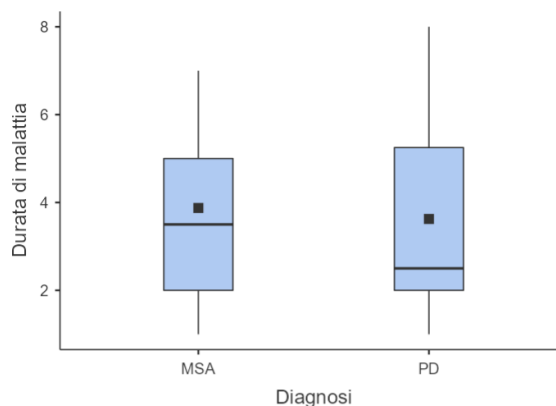


Figura 6. Durata di malattia nel gruppo MSA e nel gruppo PD.

## 4.2 - Valutazione clinica

### 4.2.1 Scala MDS-UPDRS nei pazienti con PD

La coorte di pazienti con PD è stata valutata clinicamente con la scala specifica per la malattia MDS-UPDRS, suddivisa nelle sezioni I (“*Non-motor aspects of experiences of daily living*”), II (“*Motor aspects of experiences of daily living*”), III (“*Motor examination*”) e IV (*Motor complications*). Una maggiore gravità della malattia corrisponde a punteggi più elevati.

I punteggi medi MDS-UPDRS sono pari all’MDS-UPDRS I a  $12.40 \pm 2.33$ , all’MDS-UPDRS II a  $6.38 \pm 2.92$ , all’MDS-UPDRS III a  $22.50 \pm 10.30$  e all’MDS-UPDRS IV a  $1.13 \pm 2.10$ . La media del punteggio MDS-UPDRS totale è  $42.4 \pm 12.8$ . (Tabella III)

MDS-UPDRS I		MDS-UPDRS II		MDS-UPDRS III		MDS-UPDRS IV		MDS-UPDRS Totale	
Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
12.40	2.33	6.38	2.92	22.50	10.30	1.13	2.10	42.4	12.8

Tabella III – Punteggi medi secondo la scala MDS-UPDRS per il gruppo PD.

### 4.2.2 Scala UMSARS nei pazienti con MSA

Per la valutazione clinica della coorte di pazienti affetti da MSA è stata usata la scala specifica per la malattia UMSARS, suddivisa nelle sezioni I (“*Historical*”) e

review”), II (“*Motor examination scale*”), III (“*autonomic examination*”) e IV (“*Global disability scale*”). Punteggi crescenti si associano a severità maggiore di malattia.

I punteggi medi UMSARS sono pari all’UMSARS I a  $17.70 \pm 7.07$ , all’UMSARS II a  $21.50 \pm 8.24$  e all’UMSARS IV a  $2.31 \pm 0.79$ . La media del punteggio UMSARS totale è  $41.5 \pm 15.8$ . (Tabella IV)

UMSARS I		UMSARS II		UMSARS IV		UMSARS Totale	
Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
17.70	7.07	21.50	8.24	2.31	0.79	41.5	15.8

**Tabella IV** – *Punteggi medi secondo la scala UMSARS per il gruppo MSA.*

#### 4.2.3 Scala COMPASS31

Nelle due coorti di pazienti, la scala COMPASS31 è stata utilizzata per indagare i sintomi di disfunzione autonoma, al fine di quantificare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo. I sei domini valutati sono intolleranza ortostatica (OH), dominio vasomotore, dominio secretomotore, funzione gastrointestinale, funzione genitourinaria e dominio pupillomotore.

Nel gruppo di pazienti con PD il punteggio medio del dominio intolleranza ortostatica è  $14.5 \pm 13.7$ , del dominio vasomotorio è  $0.500 \pm 1.410$ , del dominio secretomotore è  $2.75 \pm 4.56$ , della funzione gastrointestinale è  $4.88 \pm 1.46$ , della funzione genitourinaria è  $1.88 \pm 2.10$  e del dominio pupillomotore è  $0.416 \pm 1.180$ ; il punteggio medio totale del COMPASS31 è pari a  $24.9 \pm 15.2$ .

Nella coorte di pazienti affetti da MSA, invece, il punteggio medio del dominio intolleranza ortostatica è di  $17.0 \pm 12.7$ , del dominio vasomotore è  $0.625 \pm 1.360$ , del dominio secretomotorio è  $0.25 \pm 1.00$ , della funzione gastrointestinale è  $3.63 \pm 3.26$ , della funzione genitourinaria è  $5.25 \pm 2.74$  e del dominio pupillomotore è  $0.146 \pm 0.583$ ; il punteggio medio totale del COMPASS31 è di  $25.9 \pm 14.7$ .

Emerge una differenza statisticamente significativa solo per la funzione genitourinaria, che risulta più compromessa nel gruppo con MSA rispetto al gruppo con PD ( $p \text{ value} = 0.004$ ). Si è rilevata anche una peggiore funzione secretiva

esocrina nel gruppo con PD, ma la differenza non è tale da essere statisticamente significativa. Non è stata rilevata una differenza significativa nel punteggio medio totale del COMPASS31 tra i due gruppi. (Tabella V)

	PD (8)		MSA (16)		U di Mann-Whitney ( <i>p value</i> )
	Media	DS	Media	DS	
Intolleranza ortostatica	14.5	13.7	17.0	12.7	0.753
Dominio vasomotore	0.500	1.410	0.625	1.360	0.813
Dominio secretomotore	2.75	4.56	0.25	1.00	0.059
Funzione gastrointestinale	4.88	1.46	3.63	3.26	0.528
Funzione genitourinaria	1.88	2.10	5.25	2.74	<b>0.004</b>
Dominio pupillomotore	0.416	1.180	0.146	0.583	0.610
Totale	24.9	15.2	25.9	14.7	0.902

**Tabella V** – Punteggi medi alla scala COMPASS31, globali e suddivisi per dominio, e differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA.

#### 4.2.4 Valutazione neuropsicologica

La valutazione neuropsicologica è stata eseguita in 6 pazienti affetti da PD e 9 pazienti con MSA, mediante *Mini mental state examination* (MMSE) e *MOntreal Cognitive Assessment* (MOCA), due test di screening per la valutazione globale delle funzioni cognitive. I punteggi ottenuti sono stati corretti per età e scolarità. Punteggi minori corrispondono a una maggiore compromissione delle funzioni cognitive.

Nel gruppo di pazienti con PD, la media dei punteggi corretti del MMSE è  $27.70 \pm 1.92/30$  mentre la media dei punteggi corretti del MoCA è  $23.20 \pm 4.36/30$ .

Nella coorte di pazienti con MSA, la media dei punteggi corretti del MMSE è  $27.20 \pm 1.85/30$  mentre la media dei punteggi corretti del MoCA è  $23.30 \pm 1.87/30$ .

Non c'è differenza statisticamente significativa tra i punteggi medi dei test neuropsicologici MMSE e MoCA nei due gruppi. (Tabella VI)

	PD (6)		MSA (9)		U di Mann-Whitney ( <i>p value</i> )
	Media	DS	Media	DS	
MMSE PC	27.70	1.92	27.20	1.85	0.674
MoCA PC	23.20	4.36	23.30	1.87	0.864

*Tabella VI – Punteggi corretti medi ai test MMSE e MoCA e differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA. PC = punteggio corretto.*

### 4.3 Neuroimaging

La PET-RM è stata eseguita in 11 pazienti con atrofia multisistemica e in 3 pazienti affetti da malattia di Parkinson.

Nella coorte di pazienti con atrofia multisistemica, in 3 pazienti (27.3%) si è evidenziato ipometabolismo a livello cerebellare. In 5 pazienti (45.5%) è presente ipometabolismo dei gangli della base, maggiormente a carico del putamen. Un paziente (9.1%) ha presentato ipocaptazione a livello dell'amigdala e un altro soggetto (9.1%) a carico dello striato. In un solo paziente (9.1%) della coorte con MSA l'esame è risultato negativo. In un paziente nella coorte con PD si è evidenziato franco ipometabolismo della corteccia parieto-temporo-occipitale bilateralmente.

### 4.4 Valutazione autonoma

#### 4.4.1 Ecografia dell'addome inferiore con calcolo del residuo post-minzionale (RPM)

L'ecografia dell'addome inferiore con calcolo del residuo post-minzionale è stata eseguita in 7 pazienti affetti da PD e in 11 pazienti della coorte con MSA. Il residuo

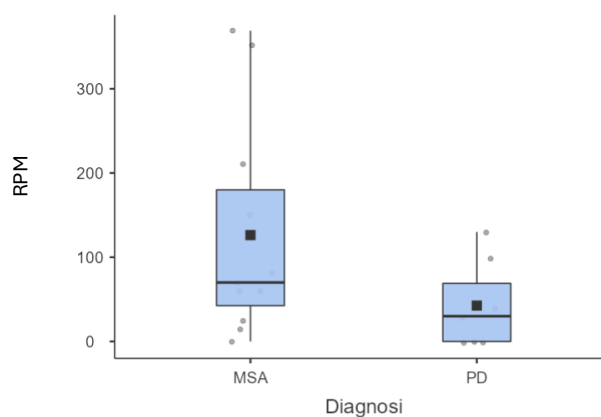
post-minzionale (RPM) è il volume di urina che rimane in vescica alla fine della minzione.

Nella coorte di pazienti affetti da PD, il valore medio del residuo post-minzionale è  $42.6 \pm 52.1$  cc. Nel gruppo di pazienti con MSA, il valore medio del RPM è  $126 \pm 130$  cc.

Il valore medio del residuo post-minzionale è maggiore nei pazienti con atrofia multisistemica rispetto a quelli affetti da malattia di Parkinson ma la differenza non è risultata statisticamente significativa. (Tabella VII)

	PD (7)		MSA (11)		Test di Welch ( <i>p</i> value)
	Media	DS	Media	DS	
Residuo post-minzionale (cc)	42.6	52.1	126	130	0.077

**Tabella VII** – Valori medi del residuo post-minzionale (RPM) e differenza tra il gruppo PD e il gruppo MSA.



**Figura 7.** Volume residuo post-minzionale (RPM) nel gruppo MSA e nel gruppo PD.

#### 4.4.2 Monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 h

Il monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 h è stato eseguito in 7 pazienti della coorte con PD e 10 pazienti del gruppo con MSA. I pazienti sono stati

classificati in base alla percentuale di variazione notturna della pressione arteriosa sistolica (PAS) in tre profili diversi:

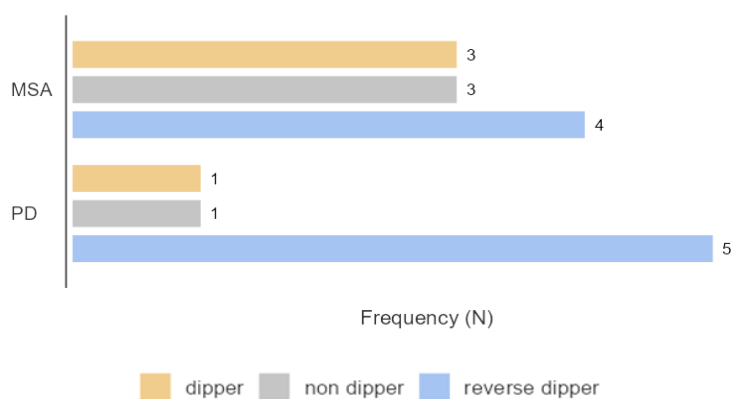
- "dipper", in caso di diminuzione notturna della PAS uguale o maggiore al 10%;
- "non-dipper", qualora la diminuzione notturna della PAS sia <10%;
- "reverse dipper", se la PAS aumenta durante il riposo notturno.

Nel gruppo dei pazienti con PD, il 14.3% ha un profilo *dipper*, il 14.3% appartiene alla categoria *non dipper* e il 71.4% rientra tra i *reverse dipper*. Nella coorte con MSA, il 30% dei pazienti ha un profilo *dipper*, il 30% rientra tra i *non dipper* mentre il restante 40% è *reverse dipper*.

Non c'è una differenza statisticamente significativa nella frequenza dei tre profili tra le due coorti. (Tabella VIII)

	PD (7)			MSA (10)			Test $\chi^2$ ( <i>p</i> value)
Profilo notturno PAS	Dipper	Non dipper	Reverse dipper	Dipper	Non dipper	Reverse dipper	0.442
Frequenza	1 (14.3%)	1 (14.3%)	5 (71.4%)	3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)	

**Tabella VIII** – Frequenza dei profili notturni di PAS e differenza tra il gruppo PD e il gruppo MSA. PAS = pressione arteriosa sistolica.



**Figura 8.** Distribuzione delle frequenze dei profili notturni di PAS nel gruppo MSA e nel gruppo PD.

#### 4.4.3 ECG dinamico secondo Holter 24 h

L'ECG dinamico secondo Holter delle 24h è stato eseguito da 4 pazienti con PD e 7 pazienti affetti da MSA. In tutti i pazienti esaminati, il tracciato elettrocardiografico ha registrato un ritmo sinusale e assenza di pause patologiche.

#### 4.4.4 Scintigrafia miocardica con [123I] MIBG

La scintigrafia miocardica con [123I] MIBG è stata eseguita da 2 pazienti affetti da PD e 8 pazienti del gruppo con MSA, al fine di valutare l'innervazione simpatica cardiaca. In base al rapporto di concentrazione del tracciante 123I-MIBG tra miocardio e regione mediastinica (H:M) nelle registrazioni tardive, la scintigrafia è stata classificata come negativa in caso di rapporto H:M tardivo  $\geq 1.6$  e positiva in caso di rapporto H:M tardivo  $< 1.6$ .

Nel gruppo con MSA, la scintigrafia miocardica con 123I-MIBG è risultata negativa in 5 pazienti (62.5%) e positiva in 3 pazienti (37.5%). Nella coorte con PD, l'esito della scintigrafia miocardica con 123I-MIBG è stato negativo in 1 paziente (50%) e positivo in 1 paziente (50%). (Tabella IX)

	PD (2)		MSA (8)	
Scintigrafia miocardica con [123I]MIBG	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
Frequenza	1 (50%)	1 (50%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)

*Tabella IX – Frequenza di positività e negatività della scintigrafia miocardica con 123I-MIBG.*

#### 4.4.5 Test autonomici cardiovascolari

##### Manovra di Valsalva

La manovra di Valsalva è stata eseguita da 5 pazienti affetti da PD e 5 pazienti con MSA. I parametri che si sono valutati sono la frequenza cardiaca basale e il Valsalva Ratio, calcolato come rapporto tra la frequenza cardiaca più alta generata durante la manovra di Valsalva (minor intervallo RR) e la frequenza cardiaca più bassa

rilevata entro 30 secondi dalla frequenza cardiaca massima (maggior intervallo RR); questo indice è espressione della funzione del sistema nervoso parasimpatico.

Nel gruppo di pazienti affetti da PD, il valore medio della frequenza cardiaca è pari a  $78.0 \pm 9.04$  bpm mentre il valore medio del Valsalva Ratio è  $1.27 \pm 0.33$ ; il valore del Valsalva ratio confrontato ai valori normali per età è risultato alterato in 2 pazienti e normale in 3 pazienti nella coorte con PD. Nella coorte di pazienti con MSA, il valore medio della frequenza cardiaca è  $76.6 \pm 12.0$  bpm mentre il valore medio del Valsalva Ratio è pari a  $1.25 \pm 0.174$ ; il valore del Valsalva ratio confrontato ai valori normali per età è risultato alterato in 3 pazienti con MSA e normale negli altri 2 pazienti. Non ci sono differenze statisticamente significative tra i valori medi della frequenza cardiaca e del Valsalva Ratio tra i due gruppi. (Tabella X)

	PD (5)		MSA (5)		U di Mann-Whitney ( <i>p value</i> )
	Media	DS	Media	DS	
Frequenza cardiaca basale	78.0	9.04	76.6	12.0	1,00
Valsalva Ratio	1.27	0.330	1.25	0.174	0,690

**Tabella X** – Valori medi dei parametri rilevati durante la manovra di Valsalva e differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA.

Si sono considerati parametri qualitativi come indici di funzionalità del sistema nervoso simpatico: l'accomodamento pressorio nella fase II e la presenza dell'*overshoot* pressorio in fase IV. Nel gruppo di pazienti con MSA, l'accomodamento pressorio in fase 2 è risultato mantenuto in 3 pazienti e alterato in 2 pazienti; anche l'*overshoot* pressorio in fase 4 è presente in 3 pazienti e assente in 2 pazienti. Nella coorte di pazienti affetti da PD, l'accomodamento pressorio in fase 2 è risultato mantenuto in 3 pazienti e alterato in 2 pazienti; anche l'*overshoot* pressorio in fase 4 è presente in 3 pazienti e assente in 2 pazienti. (Tabella XI)



	PD (5)		MSA (5)	
	Conservato	Alterato	Conservato	Alterato
Accomodamento pressorio in fase 2	3	2	3	2
<i>Overshoot</i> in fase 4	3	2	3	2

**Tabella XI** – Frequenza di alterazione dell'accomodamento pressorio in Fase 2 e dell'overshoot pressorio in fase 4.

Tra i valori del Valsalva Ratio e il punteggio del dominio OH del COMPASS31 si è rilevata una correlazione inversa debole-moderata ( $r$  di Pearson = - 0.377) ma non significativa ( $p$  value = 0.284).

#### Analisi spettrale dell'HRV

L'analisi spettrale dell'HRV è stata eseguita in 6 pazienti del gruppo con PD e 5 pazienti della coorte con MSA. Il parametro considerato è il rapporto tra le potenze della banda a bassa frequenza e ad alta frequenza, LF/HF, in ortostatismo e clinostatismo, e la sua variazione al cambio di posizione.

Nei pazienti con PD, la media del rapporto LF/HF è  $3.32 \pm 3.47$  in clinostatismo e  $7.68 \pm 3.22$  in ortostatismo usando la trasformata rapida di Fourier (FFT). Applicando il modello autoregressivo, la media del rapporto LF/HF è  $2.66 \pm 3.07$  in clinostatismo e  $7.17 \pm 6.54$  in ortostatismo.

Nei pazienti con MSA, la media del rapporto LF/HF è  $2.10 \pm 1.67$  in clinostatismo e  $6.23 \pm 5.17$  in ortostatismo, quando l'algoritmo usato per l'analisi spettrale è la trasformata rapida di Fourier. Usando il modello autoregressivo, la media del rapporto LF/HF è  $1.46 \pm 1.53$  in clinostatismo e  $10.6 \pm 16.4$  in ortostatismo.

L'incremento del rapporto LF/HF al passaggio dalla posizione supina a quella eretta è indicativo di attivazione simpatica; in tutti i pazienti sottoposti ad analisi spettrale è presente un aumento del rapporto LF/HF al passaggio dal clino all'ortostatismo. Nella coorte di pazienti con PD, il valore medio di  $\Delta$ LF/HF è  $4.36 \pm 1.49$  usando la

trasformata rapida di Fourier e  $4.51 \pm 3.68$  applicando il modello autoregressivo. Nel gruppo di pazienti con MSA, il valore medio di  $\Delta LF/HF$  è  $4.13 \pm 5.59$  usando la trasformata rapida di Fourier e  $9.16 \pm 15.80$  applicando il modello autoregressivo.

Tra i due gruppi di pazienti non sono presenti differenze statisticamente significative nel valore del rapporto LF/HF, in ortostatismo e clinostatismo, e nell'entità dell'aumento di questo rapporto al passaggio dalla posizione supina a quella eretta. (Tabella XII)

	PD (6)		MSA (5)		U di Mann-Whitney ( <i>p value</i> )
	Media	DS	Media	DS	
LF/HF Clinostatismo (FFT)	3.32	3.47	2.10	1.67	0.792
LF/HF Ortostatismo (FFT)	7.68	3.22	6.23	5.17	0.537
LF/HF Clinostatismo (AR)	2.66	3.07	1.46	1.53	0.792
LF/HF Ortostatismo (AR)	7.17	6.54	10.6	16.4	0.792
$\Delta$ LF/HF Orto – Clino (FFT)	4.36	1.49	4.13	5.59	0.429
$\Delta$ LF/HF Orto – Clino (AR)	4.51	3.68	9.16	15.80	0.792

**Tabella XII** – Valori medi del rapporto LF/HF in clinostatismo, ortostatismo e del  $\Delta LF/HF$  tra ortostatismo e clinostatismo. Differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA. LF = potenza della banda a bassa frequenza; HF = potenza della banda ad alta frequenza; FFT = trasformata rapida di Fourier; AR = modello autoregressivo.

### Deep breathing test

Il deep breathing test è stato eseguito da 3 pazienti della coorte con PD e 3 pazienti affetti da MSA. Il parametro del test considerato è l'*Expiration/Inspiration ratio* (E/I) che consiste nel rapporto tra l'intervallo RR più lungo durante l'espirazione e quello più corto durante l'inspirazione, indice della funzione cardiovagale. (Tabella XIII)

Nel gruppo di pazienti con PD, la media dell'E/I è  $1.26 \pm 0.088$  mentre nella coorte con MSA è pari a  $1.24 \pm 0.094$ .

Tra i valori dell'*Expiration/Inspiration ratio* e il punteggio del dominio OH del COMPASS31 non si è evidenziata una correlazione statisticamente significativa. ( $r$  di Pearson = - 0.101 e  $p$  value = 0.849).

	PD (3)			MSA (3)		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
Frequenza cardiaca	78.7	77.4	79.8	73.9	57.6	88.6
E/I	1.24	1.18	1.35	1.20	1.18	1.35

**Tabella XIII** – Mediana, minimo e massimo dei parametri rilevati al *deep breathing test*. E/I = *Expiration/Inspiration ratio*.

#### Head up Tilt test

L'*Head up tilt test* è stato eseguito da 4 pazienti con PD e 5 pazienti nel gruppo con MSA, al fine di valutare la risposta della pressione arteriosa sistolica (PAS), diastolica (PAD) e della frequenza cardiaca (FC) al cambio passivo di posizione. (Tabella XIV) Non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra i valori di PAS, PAD e FC in clinostatismo, a 3 minuti e a 10 minuti dal cambio passivo di posizione. (Tabella XV)

La presenza di ipotensione ortostatica, definita come una diminuzione sostenuta della PAS di almeno 20 mmHg o della PAD di almeno 10 mmHg entro i primi 3 minuti dall'ortostatismo passivo, è stata rilevata in 1 paziente (25%) con malattia di Parkinson e in 3 pazienti (60%) affetti da atrofia multisistemica.

	PD (4)			MSA (5)		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
PAS Clino	144	133	185	142	115	149
PAD Clino	73	71	97	80	63	81
FC Clino	67.5	65	84	65	49	84
PAS 3 min tilt	143	136	161	128	82	156
PAD 3 min tilt	89.5	79	105	82	57	104
FC 3 min tilt	78.0	74	85	72	71	103
PAS 10 min tilt	144	131	160	136	91	154
PAD 10 min tilt	84.5	79	93	83	56	103
FC 10 min tilt	74.5	61	87	74	65	97
$\Delta$ PAS 3 min	-4.50	-42	28	-21	-33	12
$\Delta$ PAS 10 min	-4.00	-25	7	-5	-29	12
$\Delta$ PAD 3 min	14.5	-12	32	2	-7	25
$\Delta$ PAD 10 min	8.00	-9	20	3	-7	24
$\Delta$ FC 3 min	7.00	1	16	12	7	22
$\Delta$ FC 10 min	7.00	-23	22	12	6	19

**Tabella XIV** – Mediana, minimo e massimo dei parametri rilevati all'head up tilt test. PAS = pressione arteriosa sistolica; PAD = pressione arteriosa diastolica; FC = frequenza cardiaca;  $\Delta$  PAS 3 min,  $\Delta$  PAD 3 min,  $\Delta$  FC 3 min = differenza tra valori rispettivamente di PAS, PAD e FC a 3 minuti dal tilt e in clinostatismo;  $\Delta$  PAS 10 min,  $\Delta$  PAD 10 min,  $\Delta$  FC 10 min = differenza tra valori rispettivamente di PAS, PAD e FC a 10 minuti dal tilt e in clinostatismo.

	PD (4)		MSA (5)		T di student (p value)
	Media	DS	Media	DS	
PAS Clino	151	24.1	139	13.9	0.367
PAD Clino	78.5	12.4	76.6	7.64	0.784
FC Clino	71.0	8.98	68.0	15.3	0.740
PAS 3 min tilt	146	10.8	126	31.4	0.270
PAD 3 min tilt	90.8	11.3	81.4	17.6	0.390
FC 3 min tilt	78.8	5.19	82.0	15.0	0.695
PAS 10 min tilt	145	12.0	130	25.7	0.334
PAD 10 min tilt	85.3	6.45	80.4	17.2	0.613
FC 10 min tilt	74.3	10.8	80.0	15.4	0.549
$\Delta$ PAS 3 min	-5.75	29.0	-13.4	22.0	0.665
$\Delta$ PAS 10 min	-6.50	13.5	-8.80	17.3	0.834
$\Delta$ PAD 3 min	12.3	19.4	4.80	13.2	0.514
$\Delta$ PAD 10 min	6.75	12.0	3.80	12.5	0.731
$\Delta$ FC 3 min	7.75	6.40	14.0	6.28	0.185
$\Delta$ FC 10 min	3.25	19.3	12.0	4.95	0.355

**Tabella XV** – Valori medi dei parametri rilevati all'head up tilt test e differenze tra il gruppo PD e il gruppo MSA. PAS = pressione arteriosa sistolica; PAD = pressione arteriosa diastolica; FC = frequenza cardiaca;  $\Delta$  PAS 3 min,  $\Delta$  PAD 3 min,  $\Delta$  FC 3 min = differenza tra valori rispettivamente di PAS, PAD e FC a 3 minuti dal tilt e in clinostatismo;  $\Delta$  PAS 10 min,  $\Delta$  PAD 10 min,  $\Delta$  FC 10 min = differenza tra valori rispettivamente di PAS, PAD e FC a 10 minuti dal tilt e in clinostatismo.

È emersa una correlazione positiva forte e statisticamente significativa tra i valori della pressione arteriosa sistolica e diastolica in clinostatismo e i punteggi del dominio OH del COMPASS31. Tra gli altri parametri rilevati all'*Head up tilt test* e il punteggio del dominio OH del COMPASS31 non si è evidenziata nessuna correlazione statisticamente significativa. (Tabella XVI)

	OH COMPASS31			OH COMPASS31			OH COMPASS31	
	r di Pearson	p value		r di Pearson	p value		r di Pearson	p value
PAS Clino	<b>0.670</b>	<b>0.048</b>	PAD Clino	<b>0.835</b>	<b>0.005</b>	FC Clino	0.049	0.901
PAS 3 min tilt	0.247	0.521	PAD 3 min tilt	0.196	0.613	FC 3 min tilt	0.107	0.783
PAS 10 min tilt	0.482	0.189	PAD10 min tilt	0.432	0.245	FC 10 min tilt	0.266	0.488
Δ PAS 3 min	-0.265	0.491	Δ PAD 3 min	-0.311	0.416	Δ FC 3 min	0.090	0.818
Δ PAS 10 min	-0.168	0.667	Δ PAD 10 min	-0.187	0.629	Δ FC 10 min	0.220	0.570

**Tabella XVI** – Indici di correlazione tra i parametri dell'*head up tilt test* e il punteggio del dominio OH del COMPASS31. PAS = pressione arteriosa sistolica; PAD = pressione arteriosa diastolica; FC = frequenza cardiaca.

#### 4.5 Biopsia di cute

La biopsia di cute, eseguita in 4 pazienti con PD e 9 pazienti con MSA, è stata analizzata mediante immunoistochimica (IHC). A ciascun campione è stato assegnato un punteggio da 0 a 1, sulla base della deposizione di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata (p-syn) a livello di quattro sedi: innervazione vascolare, innervazione delle ghiandole, terminazioni nervose libere e grandi fibre nervose dermiche e ipodermiche. Ogni localizzazione è stata valutata assegnando punteggio 0 se negativa e 1 se positiva e il punteggio medio è stato calcolato come media dei punteggi assegnati a ciascun fattore. Quando almeno un fattore ha un punteggio di 1, con punteggio medio superiore o uguale a 0.25, il paziente è stato considerato positivo per  $\alpha$ -sinucleinopatia.

Nel gruppo di pazienti affetti da PD, nessun paziente ha ottenuto punteggio medio pari a 0, pertanto tutti i soggetti sono risultati positivi per  $\alpha$ -sinucleinopatia. La media del punteggio medio IHC è pari a  $0.500 \pm 0.204$ . Nella coorte con MSA, 3 pazienti (33.3%) hanno ottenuto punteggio 0, risultando negativi per  $\alpha$ -sinucleinopatia. La media del punteggio medio IHC è pari a  $0.444 \pm 0.391$ . (Tabella XVII) Non c'è differenza statisticamente significativa nei punteggi medi IHC tra le due coorti di pazienti. (Tabella XVIII)

Punteggio medio IHC	Frequenza	
	PD (4)	MSA (9)
0	0	3 (33.3%)
0.25	1 (25%)	1 (11.1%)
0.5	2 (50%)	1 (11.1%)
0.75	1 (25%)	3 (33.3%)
1	0	1 (11.1%)

**Tabella XVII** – Distribuzione di frequenza dei punteggi medi IHC nel gruppo PD e nel gruppo MSA. IHC=immunoistochimica.

	PD (4)		MSA (9)		T di Welch ( <i>p</i> value)
	Media	DS	Media	DS	
Punteggio medio IHC	0.500	0.204	0.444	0.391	0.744

**Tabella XVIII** – Media dei punteggi medi IHC e differenza tra gruppo PD e gruppo MSA. IHC=immunoistochimica.

Considerando le singole localizzazioni, l'innervazione vascolare e l'innervazione ghiandolare sono risultate positive per  $\alpha$ -sinucleina fosforilata (punteggio pari a 1) nel 50% (2/4) dei pazienti con PD e nel 44.4% (4/9) dei pazienti affetti da MSA. A livello delle terminazioni nervose libere, non si è riscontrata positività per  $\alpha$ -

sinucleina fosforilata in nessun paziente con PD mentre il 22.2% (2/9) dei pazienti con MSA sono risultati positivi. Le grandi fibre nervose dermiche e ipodermiche sono risultate positive per  $\alpha$ -sinucleina fosforilata in tutti i pazienti affetti da PD e nel 55.6% (5/9) dei pazienti affetti da MSA. Non è emersa una differenza statisticamente significativa nella localizzazione dei depositi di p-syn tra i due gruppi. (Tabella XIX)

Localizzazione anatomica p-syn	PD (4)		MSA (9)		Test $\chi^2$ ( <i>p</i> value)
	Positiva (1)	Negativa (0)	Positiva (1)	Negativa (0)	
Innervazione vascolare	2 (50%)	2 (50%)	4 (44.4%)	5 (55.6%)	0.853
Innervazione delle ghiandole	2 (50%)	2 (50%)	4 (44.4%)	5 (55.6%)	0.853
Terminazioni nervose libere	0 (0%)	4 (100%)	2 (22.2%)	7 (77.8%)	0.305
Fibre nervose dermiche e ipodermiche	4 (100%)	0 (0%)	5 (55.6%)	4 (44.4%)	0.109

**Tabella XIX** – Distribuzione di frequenza della localizzazione dei depositi di p-syn nel gruppo PD e nel gruppo MSA. p-syn =  $\alpha$ -sinucleina fosforilata.

È emersa una differenza statisticamente significativa nella durata di malattia tra i pazienti positivi e i pazienti negativi per la presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata, con durata maggiore di malattia nei pazienti negativi. (Tabella XX)



	Positività per p-syn		Negatività per p-syn		T di student ( <i>p value</i> )
	Media	DS	Media	DS	
Durata di malattia	3.70	1.34	6.33	1.15	<b>0.011</b>

**Tabella XX** – Durata di malattia e differenza nei pazienti positivi e negativi per p-syn. p-syn =  $\alpha$ -sinucleina fosforilata.

Non sono emerse correlazioni significative tra lo score IHC e il punteggio totale del COMPASS31, dell'MDS-UPDRS e dell'UMSARS. (Tabella XXI)

		COMPASS31	MDS-UPDRS	UMSARS
Punteggio medio IHC	r di Pearson	0.083	-0.214	0.100
	<i>p value</i>	0.787	0.863	0.784

**Tabella XXI** – Indici di correlazione tra il punteggio medio dell'IHC e i punteggi totali di COMPASS31, MDS-UPDRS e UMSARS.

## 5 Discussione

La disfunzione autonoma è una caratteristica comune a malattia di Parkinson e atrofia multisistemica, che impatta sulla qualità della vita dei pazienti e, talvolta, sulla loro sopravvivenza, in particolare quando la compromissione interessa il dominio cardiovascolare.

Lo scopo di questo studio è stato ricercare *markers* precoci di disfunzione autonoma nell'atrofia multisistemica e nella malattia di Parkinson, identificando il loro ruolo nel supportare la diagnosi differenziale tra le due patologie. In particolare, lo studio si è concentrato sulla valutazione del coinvolgimento del sistema nervoso autonomo urinario e cardiovascolare.

Globalmente, la severità della compromissione autonoma, valutata clinicamente tramite la scala COMPASS31, è risultata simile nei pazienti affetti da PD e in quelli con MSA coinvolti.

Considerando i disturbi del tratto urinario inferiore, in linea con dati già noti (93), dal nostro studio è emersa una differenza significativa nella sintomatologia riferita dai pazienti appartenenti alle due coorti, con maggiore gravità nei soggetti con MSA rispetto a quelli affetti da PD. A conferma di altri studi precedenti, nel 2017 Yamamoto et al. hanno paragonato diversi parametri urodinamici, dimostrando la superiorità del residuo post-minzionale nel differenziare l'atrofia multisistemica dalla malattia di Parkinson. (107) Nel nostro studio abbiamo usato come parametro per valutare la disfunzione urinaria il residuo post-minzionale, la cui presenza è stata indagata tramite l'ecografia addominale, uno strumento più pratico rispetto all'uoflussometria. Nella coorte di pazienti affetti da MSA, il residuo post-minzionale è risultato maggiore rispetto a quello nei pazienti con PD, nonostante la differenza non sia stata tale da essere statisticamente significativa. La diversa tendenza registrata nei due gruppi insieme alla disponibilità e al facile utilizzo dell'ecografia suggeriscono che questo strumento possa essere utile nel supportare la diagnosi differenziale tra le due malattie. A causa dell'insufficiente potere

statistico del nostro studio, è necessario validare i risultati in una popolazione più ampia di soggetti.

Per quanto riguarda il dominio cardiovascolare, la valutazione clinica non ha mostrato differenze significative nella severità dei sintomi di ipotensione ortostatica riferiti dai pazienti appartenenti alle due coorti. Diversi esami diagnostici sono stati impiegati al fine di indagare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo cardiovascolare: il monitoraggio continuo della pressione arteriosa delle 24h, la scintigrafia miocardica con [123I] MIBG e i test autonomici cardiovascolari.

In precedenti studi, la presenza di un profilo patologico della pressione arteriosa notturna è stata rilevata tramite monitoraggio continuo della pressione arteriosa 24h complessivamente in circa metà dei pazienti affetti da malattia di Parkinson e atrofia multisistemica. (108) Nel nostro studio, si è evidenziata la presenza di alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa con prevalenza pari al 70% nei pazienti con MSA e all'85.7% nei pazienti con PD che hanno eseguito il monitoraggio dinamico della pressione arteriosa. La frequenza più elevata nei soggetti con malattia di Parkinson si ritiene essere associata alla selezione dei pazienti, essendo stati inclusi solo soggetti con PD con sintomi di disfunzione autonoma, a differenza degli altri studi in cui non era presente questo criterio di inclusione.

È stato dimostrato che le alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa, in particolare il profilo *reverse dipper*, e l'ipertensione notturna correlano con aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare. Nei soggetti affetti da malattia di Parkinson con elevati valori notturni di PAS è stata evidenziata la presenza di iperintensità della sostanza bianca cerebrale (*WMHs*), segno associato a maggior rischio di stroke, demenza e mortalità. (109) Inoltre, uno studio condotto da C. Di Stefano et al. nel 2019 ha dimostrato un'associazione tra profilo *reverse dipper* in pazienti con malattia di Parkinson e rimodellamento cardiaco, con ipertrofia del ventricolo sinistro rilevata all'ecocardiografia, assente nei pazienti con PD e *dipping* conservato. (110)

Nonostante non sia stata rilevata una differenza significativa nella frequenza delle alterazioni tra i due gruppi di pazienti, l'elevata percentuale di *reverse dippers* nella

nostra coorte di pazienti con PD, pari al 71.4%, e l'aumentato rischio cardiovascolare associato a questo profilo della PAS suggeriscono che il monitoraggio pressorio continuo delle 24h dovrebbe essere un esame svolto di routine nei pazienti con PD e MSA, al fine di poter diagnosticare precocemente alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa e prevenire gli eventi avversi correlati.

Studi basati sull'uso della scintigrafia miocardica con [123I]MIBG hanno dimostrato come una ridotta captazione del tracciante, espressa da un rapporto H/M tardivo inferiore alla norma, sia tipica della malattia di Parkinson; questo è coerente con la prevalente degenerazione delle fibre simpatiche postgangliari nei pazienti con PD. (111) Nel nostro studio, nel 37.5% dei pazienti con MSA sottoposti all'esame, la scintigrafia miocardica con [123I]MIBG è risultata positiva, con rapporti H/M inferiori ai limiti di norma. Questa evidenza è probabilmente conseguenza di una compromissione periferica presente in una quota di pazienti con MSA, documentata anche in altri studi. Tra questi, Kimpinski et. al. nel 2012 hanno rilevato una ridotta captazione del tracciante in 3/9 pazienti con MSA, similmente a quanto emerso nel nostro studio. (112) A supporto dei nostri risultati, si pone uno studio autoptico condotto in una coorte di 26 pazienti con MSA che ha riscontrato nel 42.3% dei soggetti un coinvolgimento dei gangli simpatici da parte dei depositi di  $\alpha$ -sinucleina. (113)

Per quanto riguarda i test autonomici cardiovascolari, numerosi studi hanno indagato la loro utilità nella diagnosi differenziale tra atrofia multisistemica e malattia di Parkinson, con risultati controversi. Nel 2015 F. Baschieri et al. hanno dimostrato una buona accuratezza diagnostica della batteria di Ewing (batteria di test autonomici cardiovascolari che include *Head up tilt test*, Manovra di Valsalva, *Deep Breathing test* e *Handgrip test*) nel discriminare PD da MSA-P, rilevando una maggiore compromissione degli indici della Manovra di Valsalva e del *Deep Breathing test* e una maggiore prevalenza di ipotensione ortostatica all'*Head up tilt test* nei pazienti con atrofia multisistemica. (86) Nell'interpretare questi risultati bisogna considerare che lo studio aveva incluso nella coorte di pazienti con malattia di Parkinson anche soggetti che non presentavano disautonomia. Uno studio

condotto nel 2020 da F. Leys et al. ha coinvolto solo pazienti affetti da atrofia multisistemica e malattia di Parkinson con ipotensione ortostatica neurogena e non ha evidenziato differenze significative negli indici dei test della batteria di Ewing tra MSA-P e PD. (114)

Nel nostro studio, un criterio di inclusione dei pazienti nel gruppo con malattia di Parkinson è stato la presenza di sintomi disautonomici. Il numero di soggetti che ha svolto la batteria di test autonomici cardiovascolari è ristretto rispetto al totale dei soggetti coinvolti, a causa della concomitante compromissione motoria che ha talvolta impedito l'esecuzione dei test o la loro esecuzione nel modo corretto, fatto che ne ha inficiato l'utilizzo nello studio. In particolare, molti pazienti non sono stati in grado di compiere il *deep breathing test* a causa dell'incapacità a svolgere uno sforzo respiratorio tale da consentire la respirazione profonda.

Nella manovra di Valsalva l'alterazione degli indici di funzione parasimpatica (Valsalva Ratio) e simpatica (valutazione dell'accomodamento pressorio in fase II e dell'overshoot in fase IV) ha frequenza simile nella coorte di pazienti affetti da MSA e in quella con PD. Questo suggerisce l'assenza di una differenza significativa tra i due gruppi nella compromissione dell'arco baroriflesso. All'analisi spettrale dell'HRV, in tutti i pazienti si è registrato un incremento del rapporto tra le potenze della banda a bassa frequenza e ad alta frequenza LF/HF al passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo, espressione di conservata attivazione simpatica in risposta al cambio di posizione. All'*head up tilt test* non si è rilevata una differenza significativa tra i valori medi di pressione arteriosa e frequenza cardiaca registrati nel corso della manovra, anche se l'ipotensione ortostatica è presente in un numero di pazienti con MSA superiore rispetto al gruppo con PD.

Nel nostro studio, è emersa una correlazione positiva forte e statisticamente significativa tra i valori della pressione arteriosa sistolica e diastolica in clinostatismo e i punteggi del dominio OH del COMPASS31. L'assenza di correlazione significativa tra i parametri della pressione arteriosa rilevati in seguito al cambio passivo di posizione all'*head up tilt test* e il punteggio del dominio OH del COMPASS31 è in linea con uno studio condotto nel 2020 da Freeman R. et al., in cui è stata dimostrata la discordanza tra la presenza di sintomatologia di

intolleranza ortostatica e i valori di pressione arteriosa sistolica rilevati all'*head up tilt test*. La maggior parte dei pazienti studiati da Freeman R. et al. era asintomatica o riferiva sintomi lievi, nonostante un'importante caduta della pressione arteriosa sistolica nel passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo e bassi valori di PAS in posizione eretta. (115)

La mancanza di correlazione significativa tra gli indici della Manovra di Valsalva e del *deep breathing test* e il punteggio del dominio OH del COMPASS31 supporta l'ipotesi secondo cui la severità dei sintomi riferiti dai pazienti non rifletta il reale coinvolgimento del sistema nervoso autonomo cardiovascolare. Ulteriori studi dovrebbero continuare a indagare la relazione tra la sintomatologia di intolleranza ortostatica e i parametri dei test autonomici cardiovascolari in ampie popolazioni. Inoltre, l'alto rischio di sincope e caduta associato all'ipotensione ortostatica anche nei pazienti asintomatici giustifica l'utilizzo nella pratica clinica di indagini strumentali al fine di indagare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo cardiovascolare.

La biopsia di cute consente di indagare in vivo la presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina a livello periferico. L'utilità dell'immunoistochimica basata sull'uso di anticorpi diretti contro l' $\alpha$ -sinucleina fosforilata (p-syn) nel distinguere i pazienti affetti da malattia di Parkinson e atrofia multisistemica dai soggetti sani è stata dimostrata da diversi studi e recentemente confermata da Gibbons et al. su un ampio campione di soggetti, in cui è stata rilevata la positività per  $\alpha$ -sinucleina fosforilata a livello cutaneo nel 92.8% dei pazienti con PD e nel 98.2% di quelli con MSA mentre in solo il 3.3% dei controlli sani. (69)

Nel nostro studio, la presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata a livello cutaneo è stata rilevata mediante immunoistochimica in tutti i pazienti con malattia di Parkinson e nel 66.7% dei pazienti con atrofia multisistemica. È emerso che i pazienti risultati negativi per p-syn hanno una durata media di malattia superiore rispetto ai soggetti positivi. Questi risultati sono coerenti con uno studio condotto nel 2020 da Donadio, in cui il 28% dei pazienti con MSA è risultato negativo per la presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata nei campioni di cute. (116) La concomitante presenza di denervazione epidermica in questa quota di pazienti ha

fatto supporre a Donadio et. al. che la causa della mancata positività sia da ricercare nella distribuzione irregolare dei depositi patologici secondaria alla denervazione. Ulteriori studi potrebbero indagare l'esistenza di una correlazione tra presenza di depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata, denervazione epidermica e durata di malattia.

Nel medesimo studio, Donadio et al. hanno rilevato una differenza nella localizzazione della  $\alpha$ -sinucleina fosforilata nelle terminazioni nervose cutanee nei pazienti con malattia di Parkinson rispetto ai pazienti affetti da atrofia multisistemica, tale da consentire la diagnosi differenziale tra le due patologie, con un coinvolgimento principalmente delle fibre nervose autonome nei pazienti con PD e delle fibre somatiche nei pazienti affetti da MSA. (116)

Nel nostro studio, non è stata rilevata questa differenza nella localizzazione dei depositi di  $\alpha$ -sinucleina fosforilata nei due gruppi di pazienti. In particolare, le fibre del sistema nervoso autonomo, che costituiscono l'innervazione vascolare e ghiandolare, sono risultate positive anche nel 44.4% dei pazienti con MSA, confermando la presenza di compromissione post-gangliare negli stessi pazienti in cui la scintigrafia miocardica con [123I]MIBG è risultata alterata.

Nel nostro studio, non si è evidenziata alcuna correlazione statisticamente significativa tra score IHC e gravità di malattia, espressa come punteggio dalle scale MDS-UPDRS e UMSARS, e severità della disfunzione autonoma, valutata tramite COMPASS31.

Il nostro studio presenta alcune limitazioni. Tra queste, la bassa numerosità della popolazione oggetto di studio, legata al reclutamento dei pazienti tra quelli ricoverati in elezione in un'unità operativa semplice che ha iniziato la sua attività a partire da ottobre 2023. Inoltre, la presenza di diversi dati mancanti rende difficile operare un confronto sistematico tra i risultati ottenuti nei test diagnostici. Questi due aspetti hanno inficiato la possibilità di operare un'analisi statistica ottimale. Altra limitazione del nostro studio è l'assenza di una diagnosi confermata tramite riscontro autoptico che si associa al rischio di inclusione dei pazienti nel gruppo errato, considerate le manifestazioni cliniche simili delle due patologie, nonostante l'utilizzo dei criteri clinici validati specifici per malattia nella diagnosi dei pazienti selezionati.

## 6 Conclusioni

Il nostro studio ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti nella valutazione clinica della funzione urinaria tramite COMPASS-31. Nonostante il volume residuo post-minzionale calcolato all'ecografia dell'addome inferiore non abbia mostrato una differenza statisticamente significativa, il valore maggiore di questo parametro nel gruppo con MSA è indicativo di una sua possibile utilità nel supportare la diagnosi differenziale tra le due malattie, mostrando la necessità di convalidare il ruolo dell'ecografia dell'addome inferiore in ulteriori studi condotti su campioni più ampi.

Inoltre, il nostro studio ha dimostrato l'importanza dell'analisi strumentale cardiovascolare nei pazienti con malattia di Parkinson e atrofia multisistemica, considerata l'elevata prevalenza delle alterazioni del ritmo circadiano della pressione arteriosa rilevata e la dubbia correlazione tra la severità dei sintomi di intolleranza ortostatica al COMPASS31 e i dati strumentali. Il monitoraggio continuo della pressione arteriosa delle 24h e i test autonomici cardiovascolari non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti.

Il presente lavoro si configura come studio pilota, che sottolinea la necessità di continuare a indagare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo nell'atrofia multisistemica e nella malattia di Parkinson in studi più ampi con lo scopo di ricercare elementi utili alla diagnosi differenziale tra le due malattie.





## 7 Bibliografia

1. Coon EA, Singer W. Synucleinopathies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2020 Feb;26(1):72-92.
2. Lamotte G, Singer W. Synucleinopathies. *Handb Clin Neurol*. 2023; 196:175-202.
3. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of  $\alpha$ -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011 Nov;10(11):1015-25.
4. Tenreiro S, Eckermann K, Outeiro TF. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front Mol Neurosci*. 2014 May 13;7:42.
5. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L.  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol Neurobiol*. 2013 Apr;47(2):537-51.
6. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Mar;11(3):155-9.
7. Parkinson's Disease. In: *Pathogenesis and Clinical Aspects*. Stoker TB and Greenland JC eds, Codon Publications Brisbane, John Van Geest Centre for Brain Repair, Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, UK. 2018.
8. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 23;3:17013.
9. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 2020;323(6):548-560.
10. Rudow G, O'Brien R, Savonenko AV, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Marsh L, Dawson TM, Crain BJ, West MJ, Troncoso JC. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008; 115: 461–470.
11. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
12. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Dec;33(6):599-614.
13. 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, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Oct;30(12):1591-601.
14. *La neurologia della Sapienza*. Berardelli A, Cruccu G eds, Esculapio Publ. 2015.

15. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006;5(3):235-245.
16. Chaudhuri KR. Nocturnal symptom complex in PD and its management. *Neurology.* 2003 Sep 23;61(6 Suppl 3):S17-23.
17. Garcia-Borreguero D, Larrosa O, Bravo M. Parkinson's disease and sleep. *Sleep Med Rev.* 2003;7(2):115-129.
18. Postuma RB, Poewe W, Litvan I, Lewis S, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Chan P, Slow E, Seppi K, Schaffer E, Rios-Romenets S, Mi T, Maetzler C, Li Y, Heim B, Bledsoe IO, Berg D. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018 Oct;33(10):1601-1608.
19. Macleod AD, Taylor KS, Counsell CE. Mortality in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29(13):1615-1622.
20. Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Ravina B, Seppi K, Coelho M, Poewe W, Rascol O, Goetz CG, Sampaio C. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011 Oct;26 Suppl 3:S2-41.
21. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA.* 2014 Apr 23-30;311(16):1670-83.
22. Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, Weintraub D, Sampaio C; the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord.* 2019 Feb;34(2):180-198.
23. Poewe W, Stankovic I, Halliday G, Meissner W, Wenning G, Pellecchia M, Seppi K, Palma JA, Kaufmann H. Multiple system atrophy. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):56.
24. Jellinger KA. Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy1. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):1141-1179.
25. Krismer F, Wenning GK. Multiple system atrophy: insights into a rare and debilitating movement disorder. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(4):232-243.
26. Fanciulli A, Stankovic I, Krismer F, Seppi K, Levin J, Wenning GK. Multiple system atrophy. *Int Rev Neurobiol.* 2019;149:137-192.
27. Song YJ, Lundvig DM, Huang Y, Gai WP, Blumbergs PC, Højrup P, Otzen D, Halliday GM, Jensen PH. p25alpha relocates in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Am J Pathol.* 2007 Oct;171(4):1291-303.

28. Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK. Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov Disord.* 2005;20 Suppl 12:S29-S36.
29. Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology.* 2008 Aug 26;71(9):670-6.
30. Lin DJ, Hermann KL, Schmahmann JD. Multiple system atrophy of the cerebellar type: clinical state of the art. *Mov Disord.* 2014;29(3):294-304.
31. Coon EA, Sletten DM, Suarez MD, Mandrekar JN, Ahlskog JE, Bower JH, Matsumoto JY, Silber MH, Benarroch EE, Fealey RD, Sandroni P, Low PA, Singer W. Clinical features and autonomic testing predict survival in multiple system atrophy. *Brain.* 2015 Dec;138(Pt 12):3623-31.
32. Fanciulli A, Göbel G, Ndayisaba JP, Granata R, Duerr S, Strano S, Colosimo C, Poewe W, Pontieri FE, Wenning GK. Supine hypertension in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Clin Auton Res.* 2016 Apr;26(2):97-105.
33. Cortelli P, Calandra-Buonaura G, Benarroch EE, Giannini G, Iranzo A, Low PA, Martinelli P, Provini F, Quinn N, Tolosa E, Wenning GK, Abbruzzese G, Bower P, Alfonsi E, Ghorayeb I, Ozawa T, Pacchetti C, Pozzi NG, Vicini C, Antonini A, Bhatia KP, Bonavita J, Kaufmann H, Pellecchia MT, Pizzorni N, Schindler A, Tison F, Vignatelli L, Meissner WG. Stridor in multiple system atrophy: Consensus statement on diagnosis, prognosis, and treatment. *Neurology.* 2019 Oct 1;93(14):630-639.
34. Stankovic I, Krismer F, Jesic A, Antonini A, Benke T, Brown RG, Burn DJ, Holton JL, Kaufmann H, Kostic VS, Ling H, Meissner WG, Poewe W, Semnic M, Seppi K, Takeda A, Weintraub D, Wenning GK; Movement Disorders Society MSA (MODIMSA) Study Group. Cognitive impairment in multiple system atrophy: a position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS Multiple System Atrophy (MODIMSA) study group. *Mov Disord.* 2014 Jun;29(7):857-67.
35. Miki Y, Foti SC, Asi YT, Tsushima E, Quinn N, Ling H, Holton JL. Improving diagnostic accuracy of multiple system atrophy: a clinicopathological study. *Brain.* 2019 Sep 1;142(9):2813-2827.
36. Koga S, Aoki N, Uitti RJ, van Gerpen JA, Cheshire WP, Josephs KA, Wszolek ZK, Langston JW, Dickson DW. When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA: an autopsy study of 134 patients. *Neurology.* 2015 Aug 4;85(5):404-12.
37. Wenning GK, Stankovic I, Vignatelli L, Fanciulli A, Calandra-Buonaura G, Seppi K, Palma JA, Meissner WG, Krismer F, Berg D, Cortelli P, Freeman R, Halliday G, Höglinger G, Lang A, Ling H, Litvan I, Low P, Miki Y, Panicker J, Pellecchia MT, Quinn N, Sakakibara R, Stamelou M, Tolosa E, Tsuji S, Warner T, Poewe W, Kaufmann H. The Movement Disorder Society Criteria for the Diagnosis of Multiple System Atrophy. *Mov Disord.* 2022 Jun;37(6):1131-1148.

38. O'Sullivan SS, Massey LA, Williams DR, Silveira-Moriyama L, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. Clinical outcomes of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Brain*. 2008 May;131(Pt 5):1362-72.
39. Boesch SM, Wenning GK, Ransmayr G, Poewe W. Dystonia in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Mar;72(3):300-3.
40. Perez-Lloret S, Flabeau O, Fernagut PO, Pavy-Le Traon A, Rey MV, Foubert-Samier A, Tison F, Rascol O, Meissner WG. Current Concepts in the Treatment of Multiple System Atrophy. *Mov Disord Clin Pract*. 2015 Feb 2;2(1):6-16.
41. Calandra-Buonaura G, Alfonsi E, Vignatelli L, Benarroch EE, Giannini G, Iranzo A, Low PA, Martinelli P, Provini F, Quinn N, Tolosa E, Wenning GK, Abbruzzese G, Bower P, Antonini A, Bhatia KP, Bonavita J, Pellecchia MT, Pizzorni N, Tison F, Ghorayeb I, Meissner WG, Ozawa T, Pacchetti C, Pozzi NG, Vicini C, Schindler A, Cortelli P, Kaufmann H. Dysphagia in multiple system atrophy consensus statement on diagnosis, prognosis and treatment. *Parkinsonism Relat Disord*. 2021 May;86:124-132.
42. Palma JA, Kaufmann H. Treatment of autonomic dysfunction in Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mov Disord*. 2018 Mar;33(3):372-390.
43. Singer W, Dietz AB, Zeller AD, Gehrking TL, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Gehrking JA, Suarez MD, Sletten DM, Minota Pacheco KV, Coon EA, Sandroni P, Benarroch EE, Fealey RD, Matsumoto JY, Bower JH, Hassan A, McKeon A, Windebank AJ, Mandrekar JN, Low PA. Intrathecal administration of autologous mesenchymal stem cells in multiple system atrophy. *Neurology*. 2019 Jul 2;93(1):e77-e87.
44. Sidoroff V, Bower P, Stefanova N, Fanciulli A, Stankovic I, Poewe W, Seppi K, Wenning GK, Krismer F. Disease-Modifying Therapies for Multiple System Atrophy: Where Are We in 2022? *J Parkinsons Dis*. 2022;12(5):1369-1387.
45. Krismer F, Seppi K, Stefanova N, Wenning GK. Toward disease modification in multiple system atrophy: Pitfalls, bottlenecks, and possible remedies. *Mov Disord*. 2016 Feb;31(2):235-40.
46. Mahlknecht P, Hotter A, Hussl A, Esterhammer R, Schocke M, Seppi K. Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7(5):300-18.
47. Jokinen P, Brück A, Aalto S, Forsback S, Parkkola R, Rinne JO. Impaired cognitive performance in Parkinson's disease is related to caudate dopaminergic hypofunction and hippocampal atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Feb;15(2):88-93.
48. Pellecchia MT, Stankovic I, Fanciulli A, Krismer F, Meissner WG, Palma JA, Panicker JN, Seppi K, Wenning GK; Members of the Movement Disorder Society Multiple System Atrophy Study Group. Can Autonomic Testing and Imaging Contribute to the Early Diagnosis of Multiple System Atrophy? A Systematic Review and Recommendations by the Movement Disorder Society Multiple System Atrophy Study Group. *Mov Disord Clin Pract*. 2020 Sep 3;7(7):750-762.

49. Bajaj S, Krismer F, Palma JA, Wenning GK, Kaufmann H, Poewe W, Seppi K. Diffusion-weighted MRI distinguishes Parkinson disease from the parkinsonian variant of multiple system atrophy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Dec 29;12(12):e0189897.
50. Wang Y, Butros SR, Shuai X, Dai Y, Chen C, Liu M, Haacke EM, Hu J, Xu H. Different iron-deposition patterns of multiple system atrophy with predominant parkinsonism and idiopathic Parkinson diseases demonstrated by phase-corrected susceptibility-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012 Feb;33(2):266-73.
51. Scherfler C, Göbel G, Müller C, Nocker M, Wenning GK, Schocke M, Poewe W, Seppi K. Diagnostic potential of automated subcortical volume segmentation in atypical parkinsonism. *Neurology*. 2016 Mar 29;86(13):1242-9.
52. Barbagallo G, Sierra-Peña M, Nemmi F, Traon AP, Meissner WG, Rascol O, Péran P. Multimodal MRI assessment of nigro-striatal pathway in multiple system atrophy and Parkinson disease. *Mov Disord*. 2016 Mar;31(3):325-34.
53. Meyer P, Frings L, Rucker G, Hellwig S. F-FDG PET in parkinsonism: differential diagnosis and cognitive impairment in Parkinson's disease. *J Nucl Med* 2017;58(12):1888–1898.
54. Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, Mollenhauer B, Blennow K, Calabresi P. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2019 Jun;18(6):573-586.
55. Hansson O, Janelidze S, Hall S, Magdalinou N, Lees AJ, Andreasson U, Norgren N, Linder J, Forsgren L, Constantinescu R, Zetterberg H, Blennow K; Swedish BioFINDER study. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology*. 2017 Mar 7;88(10):930-937.
56. Singer W, Schmeichel AM, Sletten DM, Gehrking TL, Gehrking JA, Trejo-Lopez J, Suarez MD, Anderson JK, Bass PH, Lesnick TG, Low PA. Neurofilament light chain in spinal fluid and plasma in multiple system atrophy: a prospective, longitudinal biomarker study. *Clin Auton Res*. 2023 Dec;33(6):635-645.
57. Williams SM, Schulz P, Sierks MR. Oligomeric  $\alpha$ -synuclein and  $\beta$ -amyloid variants as potential biomarkers for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Eur J Neurosci* 2016; 43: 3–16.
58. Daniele S, Frosini D, Pietrobono D, Petrozzi L, Lo Gerfo A, Baldacci F, Fusi J, Giacomelli C, Siciliano G, Trincavelli ML, Franzoni F, Ceravolo R, Martini C, Bonuccelli U.  $\alpha$ -Synuclein Heterocomplexes with  $\beta$ -Amyloid Are Increased in Red Blood Cells of Parkinson's Disease Patients and Correlate with Disease Severity. *Front Mol Neurosci*. 2018 Feb 22;11:53.
59. Foulds PG, Diggle P, Mitchell JD, Parker A, Hasegawa M, Masuda-Suzukake M, Mann DM, Allsop D. A longitudinal study on  $\alpha$ -synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2013;3:2540.
60. Eusebi P, Giannandrea D, Biscetti L, Abraha I, Chiasserini D, Orso M, Calabresi P, Parnetti L. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's

disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2017 Oct;32(10):1389-1400.

61. Sako W, Murakami N, Izumi Y, Kaji R. Reduced alpha-synuclein in cerebrospinal fluid in synucleinopathies: evidence from a meta-analysis. *Mov Disord* 2014; 29: 1599–605.

62. Paciotti S, Bellomo G, Gatticchi L, Parnetti L. Are We Ready for Detecting  $\alpha$ -Synuclein Prone to Aggregation in Patients? The Case of "Protein-Misfolding Cyclic Amplification" and "Real-Time Quaking-Induced Conversion" as Diagnostic Tools. *Front Neurol.* 2018 Jun 6;9:415.

63. Groveman BR, Orrù CD, Hughson AG, Raymond LD, Zanusso G, Ghetti B, Campbell KJ, Safar J, Galasko D, Caughey B. Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated  $\alpha$ -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by  $\alpha$ Syn RT-QuIC. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Feb 9;6(1):7. Erratum in: *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Nov 5;8(1):180.

64. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019 Aug;90(8):870-881.

65. Hu X, Yang Y, Gong D. Cerebrospinal fluid levels of neurofilament light chain in multiple system atrophy relative to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci.* 2017 Mar;38(3):407-414.

66. Herbert MK, Aerts MB, Beenes M, Norgren N, Esselink RA, Bloem BR, Kuiperij HB, Verbeek MM. CSF Neurofilament Light Chain but not FLT3 Ligand Discriminates Parkinsonian Disorders. *Front Neurol.* 2015 May 5;6:91.

67. Zetterberg H. Neurofilament light: a dynamic cross-disease fluid biomarker for neurodegeneration. *Neuron* 2016; 91: 1–3.

68. Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Tanaka K, Suenaga T, Takahashi R. Value of in vivo  $\alpha$ -synuclein deposits in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2019 Oct;34(10):1452-1463.

69. Gibbons CH, Levine T, Adler C, Bellaire B, Wang N, Stohl J, Agarwal P, Aldridge GM, Barboi A, Evidente VGH, Galasko D, Geschwind MD, Gonzalez-Duarte A, Gil R, Gudesblatt M, Isaacson SH, Kaufmann H, Khemani P, Kumar R, Lamotte G, Liu AJ, McFarland NR, Miglis M, Reynolds A, Sahagian GA, Saint-Hillaire MH, Schwartzbard JB, Singer W, Soileau MJ, Vernino S, Yerstein O, Freeman R. Skin Biopsy Detection of Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein in Patients With Synucleinopathies. *JAMA.* 2024 Apr 16;331(15):1298-1306.

70. Gibbons C, Wang N, Rajan S, Kern D, Palma JA, Kaufmann H, Freeman R. Cutaneous  $\alpha$ -Synuclein Signatures in Patients With Multiple System Atrophy and Parkinson Disease. *Neurology.* 2023 Apr 11;100(15):e1529-e1539. Erratum in: *Neurology.* 2023 Oct 10;101(15):684.

71. Donadio V, Incensi A, El-Agnaf O, Rizzo G, Vaikath N, Del Sorbo F, Scaglione C, Capellari S, Elia A, Stanzani Maserati M, Pantieri R, Liguori R. Skin  $\alpha$ -synuclein

deposits differ in clinical variants of synucleinopathy: an in vivo study. *Sci Rep*. 2018 Sep 24;8(1):14246.

72. Donadio V, Wang Z, Incensi A, Rizzo G, Fileccia E, Vacchiano V, Capellari S, Magnani M, Scaglione C, Stanzani Maserati M, Avoni P, Liguori R, Zou W. In Vivo Diagnosis of Synucleinopathies: A Comparative Study of Skin Biopsy and RT-QuIC. *Neurology*. 2021 May 18;96(20):e2513-e2524. Erratum in: *Neurology*. 2022 Jul 5;99(1):40-42.

73. Kuzkina A, Bargar C, Schmitt D, Rößle J, Wang W, Schubert AL, Tatsuoka C, Gunzler SA, Zou WQ, Volkmann J, Sommer C, Doppler K, Chen SG. Diagnostic value of skin RT-QuIC in Parkinson's disease: a two-laboratory study. *NPJ Parkinsons Dis*. 2021 Nov 15;7(1):99.

74. Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Toucheffeu Y, Vrignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, Neunlist M. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*. 2008 Dec;57(12):1741-3.

75. Chung SJ, Kim J, Lee HJ, Ryu HS, Kim K, Lee JH, Jung KW, Kim MJ, Kim MJ, Kim YJ, Yun SC, Lee JY, Hong SM, Myung SJ. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord*. 2016 Feb;31(2):241-9.

76. Shin C, Park SH, Yun JY, Shin JH, Yang HK, Lee HJ, Kong SH, Suh YS, Shen G, Kim Y, Kim HJ, Jeon B. Fundamental limit of alpha-synuclein pathology in gastrointestinal biopsy as a pathologic biomarker of Parkinson's disease: Comparison with surgical specimens. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017 Nov;44:73-78.

77. Yan F, Chen Y, Li M, Wang Y, Zhang W, Chen X, Ye Q. Gastrointestinal nervous system  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jul;97(28):e11337.

78. Coon EA, Cutsforth-Gregory JK, Benarroch EE. Neuropathology of autonomic dysfunction in synucleinopathies. *Mov Disord* 2018; 33(3):349-358.

79. Freeman R, Wieling W, Axelrod FB, Benditt DG, Benarroch E, Biaggioni I, Cheshire WP, Chelimsky T, Cortelli P, Gibbons CH, Goldstein DS, Hainsworth R, Hilz MJ, Jacob G, Kaufmann H, Jordan J, Lipsitz LA, Levine BD, Low PA, Mathias C, Raj SR, Robertson D, Sandroni P, Schatz I, Schondorff R, Stewart JM, van Dijk JG. Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, neurally mediated syncope and the postural tachycardia syndrome. *Clin Auton Res*. 2011 Apr;21(2):69-72.

80. Joseph A, Wanono R, Flamant M, Vidal-Petiot E. Orthostatic hypotension: A review. *Nephrol Ther*. 2017 Apr;13 Suppl 1:S55-S67.

81. Gibbons CH, Freeman R. Delayed orthostatic hypotension: a frequent cause of orthostatic intolerance. *Neurology*. 2006; 67: 28-32.

82. Kaufmann H, Norcliffe-Kaufmann L, Palma JA. Baroreflex Dysfunction. *N Engl J Med*. 2020 Jan 9;382(2):163-178.



83. Norcliffe-Kaufmann L, Kaufmann H, Palma JA, Shibao CA, Biaggioni I, Peltier AC, Singer W, Low PA, Goldstein DS, Gibbons CH, Freeman R, Robertson D; Autonomic Disorders Consortium. Orthostatic heart rate changes in patients with autonomic failure caused by neurodegenerative synucleinopathies. *Ann Neurol*. 2018 Mar;83(3):522-531.
84. Velseboer DC, de Haan RJ, Wieling W, Goldstein DS, de Bie RM. Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Dec;17(10):724-9.
85. Mendoza-Velásquez JJ, Flores-Vázquez JF, Barrón-Velázquez E, Sosa-Ortiz AL, Illigens BW, Siepmann T. Autonomic Dysfunction in  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Front Neurol*. 2019 Apr 12;10:363.
86. Baschieri F, Calandra-Buonaura G, Doria A, Mastrolilli F, Palareti A, Barletta G, Solieri L, Guaraldi P, Martinelli P, Cortelli P. Cardiovascular autonomic testing performed with a new integrated instrumental approach is useful in differentiating MSA-P from PD at an early stage. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 May;21(5):477-82.
87. Vallelonga F, Maule S. Diagnostic and therapeutical management of supine hypertension in autonomic failure: a review of the literature. *J Hypertens*. 2019 Jun;37(6):1102-1111.
88. Low PA, Tomalia VA, Park KJ. Autonomic function tests: some clinical applications. *J Clin Neurol*. 2013 Jan;9(1):1-8.
89. Goldstein DS, Cheshire WP Jr. Beat-to-beat blood pressure and heart rate responses to the Valsalva maneuver. *Clin Auton Res*. 2017 Dec;27(6):361-367.
90. Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Front Public Health*. 2017 Sep 28; 5:258.
91. Pilleri M, Levedianos G, Weis L, Gasparoli E, Facchini S, Biundo R, Formento-Dojot P, Antonini A. Heart rate circadian profile in the differential diagnosis between Parkinson disease and multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Feb;20(2):217-21.
92. Gan J, Wan Y, Shi J, Zhou M, Lou Z, Liu Z. A survey of subjective constipation in Parkinson's disease patients in shanghai and literature review. *BMC Neurol*. 2018; 18:1-9.
93. Sakakibara R, Tateno F, Yamamoto T, Uchiyama T, Yamanishi T. Urological dysfunction in synucleinopathies: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin Auton Res*. 2018; 28:83-101.
94. Sakakibara R, Hattori T, Uchiyama T, Kita K, Asahina M, Suzuki A, Yamanishi T. Urinary dysfunction and orthostatic hypotension in multiple system atrophy: which is the more common and earlier manifestation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000 Jan;68(1):65-9.

95. Fowler C. Videodynamic and sphincter motor unit potential analyses in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71(5):575.
96. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet*. 2013 Jan 12;381(9861):153-65.
97. Yang Y, Liu H, Lin T, Kuo Y, Hsieh T. Relationship between erectile dysfunction, comorbidity, and Parkinson's disease: evidence from a population-based longitudinal study. *J Clin Neurol*. 2017; 13:250.
98. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, van Hilten JJ, LaPelle N; Movement Disorder Society UPDRS Revision Task Force. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*. 2008 Nov 15;23(15):2129-70.
99. Wenning GK, Tison F, Seppi K, Sampaio C, Diem A, Yekhlef F, Ghorayeb I, Ory F, Galitzky M, Scaravilli T, Bozi M, Colosimo C, Gilman S, Shults CW, Quinn NP, Rascol O, Poewe W; Multiple System Atrophy Study Group. Development and validation of the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS). *Mov Disord*. 2004 Dec;19(12):1391-402.
100. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, Mandrekar J, Singer W. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin Proc*. 2012 Dec;87(12):1196-201.
101. Kukull WA, Larson EB, Teri L, Bowen J, McCormick W, Pfanschmidt ML. The Mini-Mental State Examination score and the clinical diagnosis of dementia. *J Clin Epidemiol*. 1994 Sep;47(9):1061-7.
102. Aiello EN, Gramegna C, Esposito A, Gazzaniga V, Zago S, Difonzo T, Maddaluno O, Appollonio I, Bolognini N. The Montreal Cognitive Assessment (MoCA): updated norms and psychometric insights into adaptive testing from healthy individuals in Northern Italy. *Aging Clin Exp Res*. 2022 Feb;34(2):375-382. Erratum in: *Aging Clin Exp Res*. 2022 Nov;34(11):2923. Erratum in: *Aging Clin Exp Res*. 2023 Nov;35(11):2857-2859.
103. Asimakopoulos AD, De Nunzio C, Kocjancic E, Tubaro A, Rosier PF, Finazzi-Agrò E. Measurement of post-void residual urine. *Neurourol Urodyn*. 2016 Jan;35(1):55-7.
104. Shields RW Jr. Heart rate variability with deep breathing as a clinical test of cardiovascular function. *Cleve Clin J Med*. 2009 Apr;76 Suppl 2:S37-40.
105. Yasuma F, Hayano J. Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? *Chest*. 2004 Feb;125(2):683-90.
106. Engström G, Hamrefors V, Fedorowski A, Persson A, Johansson ME, Ostensfeld E, Goncalves I, Markstad H, Johnson LSB, Persson M, Carlson J,

Platonov PG. Cardiovagal Function Measured by the Deep Breathing Test: Relationships With Coronary Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2022 Apr 5;11(7):e024053.

107. Yamamoto T, Asahina M, Yamanaka Y, Uchiyama T, Hirano S, Fuse M, Koga Y, Sakakibara R, Kuwabara S. Postvoid residual predicts the diagnosis of multiple system atrophy in Parkinsonian syndrome. *J Neurol Sci.* 2017 Oct 15;381:230-234.

108. Fanciulli A, Strano S, Ndayisaba JP, Goebel G, Gioffrè L, Rizzo M, Colosimo C, Caltagirone C, Poewe W, Wenning GK, Pontieri FE. Detecting nocturnal hypertension in Parkinson's disease and multiple system atrophy: proposal of a decision-support algorithm. *J Neurol.* 2014 Jul;261(7):1291-9.

109. Oh YS, Kim JS, Yang DW, Koo JS, Kim YI, Jung HO, Lee KS. Nighttime blood pressure and white matter hyperintensities in patients with Parkinson disease. *Chronobiol Int.* 2013 Jul;30(6):811-7.

110. Di Stefano C, Sobrero G, Milazzo V, Vallelonga F, Romagnolo A, Zibetti M, Milan A, Veglio F, Maule S. Cardiac organ damage in patients with Parkinson's disease and reverse dipping. *J Hypertens.* 2020 Feb;38(2):289-294.

111. Braune S, Reinhardt M, Schnitzer R, Riedel A, Lucking CH. Cardiac uptake of [123I]MIBG separates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Neurology.* 1999; 53(5):1020-5.

112. Kimpinski K, Iodice V, Burton DD, Camilleri M, Mullan BP, Lipp A, Sandroni P, Gehrking TL, Sletten DM, Ahlskog JE, Fealey RD, Singer W, Low PA. The role of autonomic testing in the differentiation of Parkinson's disease from multiple system atrophy. *J Neurol Sci.* 2012 Jun 15;317(1-2):92-6.

113. Sone M, Yoshida M, Hashizume Y, Hishikawa N, Sobue G. alpha-Synuclein-immunoreactive structure formation is enhanced in sympathetic ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.* 2005; 110(1):19-26.

114. Leys F, Fanciulli A, Ndayisaba JP, Granata R, Struhal W, Wenning GK. Cardiovascular autonomic function testing in multiple system atrophy and Parkinson's disease: an expert-based blinded evaluation. *Clin Auton Res.* 2020 Jun;30(3):255-263.

115. Freeman R, Illigens BMW, Lapusca R, Campagnolo M, Abuzinadah AR, Bonyhay I, Sinn DI, Miglis M, White J, Gibbons CH. Symptom Recognition Is Impaired in Patients with Orthostatic Hypotension. *Hypertension.* 2020 May;75(5):1325-1332.

116. Donadio V, Incensi A, Rizzo G, De Micco R, Tessitore A, Devigili G, Del Sorbo F, Bonvegna S, Infante R, Magnani M, Zenesini C, Vignatelli L, Cilia R, Eleopra R, Tedeschi G, Liguori R. Skin Biopsy May Help to Distinguish Multiple System Atrophy-Parkinsonism from Parkinson's Disease With Orthostatic Hypotension. *Mov Disord.* 2020 Sep;35(9):1649-1657.