



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze

**Corso di Laurea Triennale in
Tecniche di Neurofisiopatologia**

Presidente: Prof. A. Antonini

**ANALISI DEI POTENZIALI EVOCATI TRANSCRANICI IN
PAZIENTI AFFETTI DA DISTURBO COGNITIVO LIEVE:
STUDIO PILOTA**

Relatore: Prof. C. Porcaro

Correlatore: Dott.ssa V. D'Onofrio

Laureando: Stradiotto Davide

Matricola: 2013606

Anno Accademico 2022-2023

ABSTRACT

Introduzione: la stimolazione magnetica transcranica (TMS) è un metodo di stimolazione cerebrale non invasivo che consente lo studio dell'eccitabilità e della plasticità della corteccia cerebrale. La co-registrazione con elettroencefalografia (EEG) permette di esaminare gli stati cerebrali e le loro dinamiche, tramite lo studio dei potenziali evocati transcranici (*Transcranial Evoked Potentials*). Il disturbo cognitivo lieve (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) è una condizione caratterizzata da decadimento cognitivo che non determina una limitazione delle attività della vita quotidiana dei soggetti affetti. La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa cronica caratterizzata da una degenerazione dei neuroni della sostanza nera del mesencefalo che determina lo sviluppo di sintomi motori.

Obiettivo: valutazione e analisi della morfologia dei TEPs in pazienti affetti da MP associata a MCI (MP-MCI), soggetti con MCI di tipo amnesico (aMCI) rispetto ad un gruppo di soggetti sani di controllo (HC). Valutazione del potenziale dei TEPs come *marker* neurofisiologico di MCI e eventuali differenze nelle diverse forme cliniche di MCI.

Materiali e Metodi: sono stati reclutati tre soggetti affetti da aMCI e tre pazienti con MP-MCI e quattro soggetti di controllo sani (HC). Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a TMS-EEG con cuffia precablata a 64 canali e stimolazione dell'area motoria primaria (M1) dell'emisfero dominante con *coil* a farfalla. Sono stati erogati 120 stimoli sovrasoglia (intensità pari al 120% della soglia motoria a riposo - RMT, intervallo inter-*pulse* variabile tra 1,5 e 1,8s) e sono stati registrati i potenziali evocati motori (PEM) dal muscolo I° interosseo dorsale della mano controlaterale all'emisfero stimolato. È stata condotta un'analisi dei dati EEG mediante software EEGLAB (MATLAB). Per ciascun soggetto è stata valutata la presenza e l'ampiezza dei picchi di attività registrati da tutti gli elettrodi (*Global Mean Field Power*, GMFP) a specifici intervalli di latenza rispetto allo stimolo TMS.

Risultati e Discussione: l'analisi morfologica dei TEPs ha mostrato differenze significative nei diversi gruppi esaminati. Nei soggetti aMCI è stato osservato un aumento dell'ampiezza della P30 rispetto agli HC. Nei pazienti con MP-MCI questa componente non è stata identificata in due soggetti su tre ed in un soggetto presentava un'ampiezza ridotta rispetto agli altri due gruppi. La componente N45 non è stata rilevata in nessun soggetto aMCI ed in un solo MP-MCI, mentre è stata riscontrata in tutti i soggetti HC. La P60 è presente in un solo aMCI e presente in tutti i pazienti MP-MCI e HC. La N100 nei MP-MCI ha ampiezze più basse rispetto agli aMCI e HC.

Conclusioni: i risultati, quindi, suggeriscono che è possibile identificare delle caratteristiche distintive della risposta corticale allo stimolo TMS sulla base dell'analisi della presenza e dell'ampiezza dei picchi di attività dei TEPs. I TEPs potrebbero rappresentare, dunque, dei marcatori neurofisiologici di malattia nelle diverse forme cliniche di MCI.

SOMMARIO

PREFAZIONE	1
1.0 INTRODUZIONE	3
1.1 Disturbo Cognitivo Lieve	4
1.1.1 Quadro epidemiologico	5
1.1.2 La malattia di Parkinson	6
1.1.3 Principi di terapia	7
1.2 Principi e metodologia TMS-EEG	7
1.2.1 Storia	8
1.2.2 Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS)	9
1.2.3 Area motoria M1	11
1.2.4 Elettroencefalografia (EEG)	13
1.2.5 TMS-EEG	16
1.2.6 Artefatti	18
1.3 Potenziali Evocati da TMS (TEPs)	19
1.3.1 Studio dei TEPs	21
1.3.2 Oscillazioni corticali correlate alla TMS	22
2.0 MATERIALI E METODI	23
2.1 Obiettivo dello studio	23
2.2 Popolazione	23
2.3 TMS	24
2.4 Registrazione EEG	25
2.5 Protocollo sperimentale	25
2.6 Analisi statistiche descrittive dei dati	27
2.7 Analisi dei segnali	27
3.0 RISULTATI	29
3.1 Caratteristiche clinico-demografiche dei soggetti	29
3.2 Analisi dei TEPs	29

3.3 TEPs soggetti MP-MCI.....	31
3.4 TEPs soggetti aMCI.....	32
3.5 TEPs soggetti HC.....	33
4.0 DISCUSSIONE.....	35
5.0 CONCLUSIONI.....	39
5.1 Proposte per il futuro.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	41

ABBREVIAZIONI

AD = Alzheimer's Disease

ADL = Activity of Daily Living

AVG = Common average reference

BSS = Blind Source Separation

CR = Common Reference

EEG = Elettroencefalogramma

EMG = Elettromiografia

EOG = Elettrooculogramma

EPSP = Potenziale Postsinaptico Eccitatorio

FDI = First Dorsal Interosseus

GMFP = Global Mean Field Power

Hc = Health Controls

IADL = Instrumental Activity of Daily Living

ICA = Independent Component Analysis

IPSP = Potenziale Postsinaptico Inibitorio

LMFP = Local Mean Field Power

MCI = Mild Cognitive Impairment

MMSE = Mini Mental State Examination

MOCA = Montreal Cognitive Assessment

MP = Malattia di Parkinson

RCTs = Randomised Controlled Trials

RM = Risonanza Magnetica

RMT = Resting Motor Threshold

TEPs = Transcranial Evoked Potentials

TMS = Stimolazione Magnetica Transcranica

PREFAZIONE

L'idea di questo studio pilota è nata dall'interesse per l'elettroencefalografia e la stimolazione magnetica transcranica maturata durante il primo e il secondo anno con particolare riguardo al corso di Tecniche Avanzate Neurofisiologiche sostenuto dalla professoressa F. Ferreri nel Corso di Laurea triennale in Tecniche di Neurofisiopatologia.

Spesso sentiamo parlare di questa professione sanitaria come nuova e poco conosciuta e ancor meno sentiamo parlare di stimolazione magnetica transcranica. Vista come un concetto di difficile comprensione ed effettivamente lo è, ma tanto affascinante che attrae sempre più nuove figure: da tecnici di neurofisiopatologia, ai medici, ai dottorati di ricerca.

Molto è stato scoperto, da quando Faraday sul finire del diciannovesimo secolo, gettò le basi che poi sarebbero servite alcuni anni dopo a scienziati e medici per costruire macchinari sempre più sofisticati per stimolare le aree cerebrali.

Molto deve essere ancora chiarito e compreso nella infinita complessità di quell'organo chiamato cervello.

Con questo studio si vuole provare a comprendere se con l'uso di questa tecnica avanzata è possibile studiare i pazienti con disturbo cognitivo a confronto con soggetti sani.

Sono particolarmente grato al mio Relatore il professor Camillo Porcaro e alla mia Correlatrice la dottoressa Valentina D'Onofrio che, condividendo questi miei obiettivi, hanno voluto sostenere questo mio studio.

Un grazie va anche alle neuropsicologhe Chiara e Francesca per l'aiuto nel selezionare i soggetti partecipanti allo studio. Ringrazio inoltre, il tecnico il dottor De Nardi Gianluigi per avermi insegnato tutti i passaggi pratico metodologici in relazione al protocollo sperimentale.

Un ringraziamento speciale all'ingegnere Matteo per avermi aiutato nell'analisi statistica dei dati dello studio.

Infine volevo ringraziare la mia famiglia e i miei compagni di corso per avermi sostenuto in questo particolare momento della mia vita aiutandomi ad affrontare le difficoltà incontrate durante il percorso accademico.

1.0 INTRODUZIONE

*“Il cervello: se lo coltivi funziona. Selo lasci andare e lo metti in pensione si indebolisce.
La sua plasticità è formidabile. Per questo bisogna continuare a pensare”*

(Rita Levi-Montalcini)

Questa affermazione, scritta da Rita Levi-Montalcini, si adatta bene all’evoluzione che le neuroscienze hanno mostrato nel corso dei secoli: lo studio delle strutture cerebrali che controllano tutte le azioni e le relazioni ha sempre affascinato l’uomo. Il cervello è l’organo più complesso del nostro organismo. È formato da oltre cento miliardi di neuroni che sono connessi a loro volta da più di centomila miliardi di sinapsi, strutture cerebrali fondamentali, che mediano il trasferimento di informazioni all’interno di reti neurali, che a loro volta consentono il controllo di tutte le funzioni del nostro organismo. Un avanzamento importante è avvenuto nel momento in cui è stato possibile studiare gli aspetti funzionali del sistema nervoso con lo sviluppo della neurofisiologia sperimentale. Studiare e conoscere la neuroplasticità e le modificazioni che avvengono nel nostro cervello rappresentava una sfida fino ad alcuni anni fa e che lo è a tutt’oggi.

Il primo elettroencefalogramma fu registrato da Hans Berger nel 1924 peraltro con notevoli difficoltà legate all’interpretazione delle onde che vennero registrate, ma da allora ha acquisito crescente importanza in ambito clinico medico. Le successive ricerche di Herbert Jasper e Penfield hanno consentito di rilevare i rapporti anatomici della corteccia cerebrale mappandola, dimostrando la correlazione tra la funzione e la rappresentazione corticale. Da allora la neurofisiologia si è arricchita di nuove tecniche che permette di indagare in maniera dettagliata la funzione del sistema nervoso e continua a mostrare sviluppi in relazione al progredire delle conoscenze e dalla tecnologia.

I futuri sviluppi vedono la possibilità di integrare i dati ottenuti mediante diverse metodiche di indagine (la stimolazione magnetica) al punto da poter indagare in maniera approfondita le relazioni tra struttura e funzione e, probabilmente, di esplorare il funzionamento di reti neurali di elevata complessità in condizioni fisiologiche e patologiche (Bertora P., 2015).

Una “svolta epocale” nel progredire delle neuroscienze cliniche è stata l’evoluzione delle metodiche di stimolazione magnetica cerebrale.

Nel 1985 si arriva alla costruzione da parte di Barker ed il gruppo di lavoro dell’Università di Sheffield di uno stimolatore magnetico che permetteva di stimolare sia i nervi che la corteccia motoria cerebrale a scalpo integro.

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) è una tecnica non invasiva e non dolorosa che permette di stimolare, attraverso brevi impulsi magnetici, aree cerebrali sottostanti lo stimolatore

determinando, così, l'eccitazione delle strutture nervose. Tutto ciò ha aperto nuove strade per studiare, indurre o manipolare meccanismi alla base dell'eccitabilità, della connettività e della plasticità del cervello umano.

La rivoluzione si è ottenuta con la combinazione di TMS ed elettroencefalografia (EEG). Questa ha consentito di esaminare in modo non invasivo gli stati cerebrali e le loro dinamiche attraverso le aree corticali motorie e non motorie, permettendo la scoperta dei potenziali evocati transcranici: i TEP. Da allora numerosi studi sono stati fatti ed altrettanti laboratori di tutto il mondo hanno permesso di arricchire il *database* di informazioni, studiando non solo le caratteristiche specifiche dei potenziali, ma osservandone come essi si modificano in relazione alle diverse malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson e la malattia di Alzheimer.

In tutto questo resta centrale il fattore umano. L'avanzamento delle tecnologie non prescinde dalla necessità di utilizzarle in maniera appropriata, considerato non solo la loro "potenza" ma anche il costo e la limitatezza; se così non fosse, alto sarebbe il rischio di considerare le risorse strumentali un sostituto alla nostra capacità di ragionamento clinico. Tutto questo vale non solo per il medico ma, per tutti i professionisti della salute (Bertora P., 2015).

Lo scopo di questa tesi di laurea è di valutare i potenziali evocati da stimolo TMS, ottenuti mediante la co-registrazione TMS-EEG, in soggetti MCI con malattia di Parkinson, soggetti aMCI e soggetti di controllo sani (HC).

1.1 Disturbo Cognitivo Lieve

Il concetto di Disturbo Cognitivo Lieve (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) spesso indicato anche come decadimento o declino cognitivo lieve, è un concetto che a tuttora è in continuo cambiamento per rappresentare uno stato di funzione cognitivo tra quello visto nell'invecchiamento normale e la demenza. Come tale è importante che gli operatori sanitari siano consapevoli della condizione e la pongano in un contesto clinico-medico appropriato (Petersen et al., 2016).

L'MCI è una sindrome caratterizzata dalla presenza di deficit cognitivi oggettivabili, maggiori rispetto a quanto previsto per l'età ed il livello di istruzione dell'individuo, ma che non interferisce in particolare con le attività della vita quotidiana (Gauthier et al., 2006). Secondo uno studio pubblicato nel 2017, l'MCI è definito come uno stadio di "pre-demenza" sintomatico nel *continuum* del declino cognitivo, caratterizzato da un deterioramento oggettivo della cognizione che non è abbastanza grave da richiedere aiuto con le attività della vita quotidiana (Sanford et al., 2017).

In un'altra revisione è specificato come l'MCI sia una transizione fra l'invecchiamento fisiologico e la forma più grave di demenza. La persona presenta vuoti di memoria, difficoltà nel linguaggio e su altre funzioni cognitive, tra cui l'attenzione, ma senza compromettere le normali attività di vita quotidiana (Langa et al., 2014).

L'MCI può essere classificato in relazione al dominio cognitivo deficitario all'esordio del disturbo. Avremo quindi:

- MCI amnesico: la persona lamenta deficit di memoria isolato;
- MCI non amnesico: quando la persona presenta un deficit isolato in un dominio cognitivo diverso dalla memoria, quale attenzione, linguaggio o funzioni esecutive;
- MCI multidominio: la persona presenta deficit in più di una funzione cognitiva.

1.1.1 Quadro epidemiologico

In base a studi epidemiologici, la prevalenza dell'MCI nella popolazione generale varia dal 3% al 19% negli adulti di età superiore ai 65 anni. Alcuni soggetti con deterioramento cognitivo sembrano rimanere stabili o tornare alla normalità nel tempo, ma più della metà della popolazione progredisce verso la demenza entro cinque anni (Gauthier et al., 2006). Uno studio del 2018, riporta che la prevalenza del MCI negli adulti di età superiore ai 60 anni ha mostrato valori variabili tra il 6,7% ed il 25,2% aumentando con l'età e con un livello di istruzione inferiore e con una maggior prevalenza negli uomini rispetto alle donne (Jongsiriyanyong et al., 2018). Numerosi studi internazionali hanno arricchito il *database* di informazioni di studi precedenti coinvolgendo diverse migliaia di soggetti e questi studi tendono a stimare la prevalenza complessiva di MCI tra il 12% ed il 18% nelle persone con età maggiore di 60 anni (Petersen et al., 2016). Attualmente in Italia, secondo i dati stimati dall'Istituto Superiore di Sanità circa 900 mila sono le persone affette da disturbo cognitivo lieve. Tuttavia, la prevalenza varia molto in termini percentuali a causa delle differenze nella definizione di MCI utilizzate nella maggior parte degli studi.

I fattori di rischio determinanti sono l'età anagrafica (più alta è l'età, maggiore è la prevalenza) e il sesso di cui gli uomini sembrano essere a più alto rischio. Ulteriori fattori identificati, includono, un basso livello di istruzione, malattie metaboliche (diabete mellito, patologie tiroidee) e cardiovascolari (ipertensione arteriosa o scompenso cardiaco cronico), la carenza di vitamina D, ed i disturbi respiratori del sonno (*Obstructive Sleep Apnea Syndrome*, OSAS).

I fattori di rischio per la progressione dell'MCI verso la demenza vengono quindi rivisti e classificati come modificabili e non modificabili. I fattori modificabili, come i fattori di rischio cardiovascolare, la depressione o gli effetti avversi dei farmaci, sono definiti come caratteristiche che se controllate (come il miglioramento del successo negli obiettivi del trattamento), possono modificare il rischio o il tasso di progressione verso la demenza. I fattori di rischio non modificabili sono definiti come “fattori di rischio che non possono essere manipolati”, e comprendono le caratteristiche demografiche e genetiche. Tale categorizzazione può fornire una piattaforma per

futuri interventi clinici mirati a fattori di rischio modificabili per ridurre la progressione dell'MCI verso la demenza (Campbell et al., 2018).

Inoltre, i pazienti con MCI amnesico più frequentemente presentano una conversione a malattia di Alzheimer (*Alzheimer's Disease, AD*). La AD è la malattia neurodegenerativa più comune caratterizzata dalla progressiva perdita di sinapsi e neuroni con accumulo di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari e prominenti deficit colinergici.

Il gruppo di lavoro del National Institute of Aging e dell'Alzheimer's Association ha proposto un criterio diagnostico nuovo che può essere applicato alla malattia di Alzheimer preclinica, al MCI dovuto alla malattia di Alzheimer e alla demenza dovuta alla malattia di Alzheimer. I criteri clinici fondamentali sono disturbo cognitivo soggettivi o oggettivi in uno o più domini della funzione cognitiva che non hanno disturbato le funzioni sociali o lavorative del paziente senza altre cause di deterioramento cognitivo (disturbi neurologici, psichiatrici, sistemici, o farmaci).

1.1.2 La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è la seconda patologia neurodegenerativa più comune dopo la AD e la definizione risale alle osservazioni del neurologo britannico James Parkinson che descriveva, in un saggio pubblica nel 1840, una sindrome da lui definita con il termine di "paralisi agitante". La MP è un'entità nosologica causata dalla perdita progressiva di neuroni dopaminergici a livello della *pars compacta* della *Substantia Nigra* mesencefalica (Poewe et al., 2017). Dal punto di vista neuropatologico, la malattia si caratterizza per la presenza di accumuli patologici di α -sinucleina con conformazioni anomale prevalentemente a livello del tronco encefalico e nei nuclei della base. Clinicamente la MP si caratterizza per la presenza di prevalenti sintomi motori (bradicinesia associata a rigidità e tremore a riposo) e da una pleora di sintomi non motori (Armstrong et al., 2020).

Il deterioramento cognitivo rappresenta una manifestazione non-motoria della patologia e presenta un importante impatto sull'autonomia funzionale e sulla qualità di vita dei pazienti. I principali fattori di rischio per lo sviluppo di MCI nella MP sono rappresentati dall'età, dalla gravità dei sintomi motori e il basso livello di istruzione. I pazienti con nuova diagnosi di MP hanno probabilità doppia di sviluppare MCI rispetto a soggetti di pari età (Kehagia et al., 2010). Tra il 20% ed il 57% dei pazienti sviluppano MCI nei primi 3-5 anni dopo la diagnosi, mentre il 17% manifesta una franca demenza dopo 5 anni dalla diagnosi (Aarsland et al., 2021). Clinicamente, il deterioramento cognitivo presenta le caratteristiche di MCI non amnesico a dominio singolo, ovvero con coinvolgimento di un solo dominio cognitivo e relativo risparmio della memoria.

La fisiopatologia dell'MCI nella MP include l'accumulo patologico di α -sinucleina e di amiloide, la disfunzione di diversi sistemi neurotrasmettitoriali in particolare colinergico e dopaminergico, e la progressiva perdita neuronale e sinaptica diffusa.

1.1.3 Principi di terapia

Attualmente non esistono trattamenti farmacologici accettati per l'MCI approvati dall'Agenzia per gli Alimenti e i Medicinali (*Food and Drug Administration*, FDA). Tuttavia, sono stati condotti numerosi studi farmacologici randomizzati nello spettro MCI, ma nessuno è riuscito a dimostrare l'efficacia nel ritardare la progressione da MCI a demenza. Uno studio ha valutato il *Donepezil* e la *Vitamina E* ad alte dosi negli MCI di tipo amnesico dimostrando scarsa efficacia nel rallentare il tasso di progressione della malattia verso la demenza (Winblad et al., 2008). Una revisione sistematica della letteratura, invece, ha messo in dubbio l'efficacia della vitamina E prendendo in considerazione tre trial clinici randomizzati (*Randomised Controlled Trials*, RTCs) per un totale di 1167 partecipanti con MCI dimostrando che la vitamina E non sia di beneficio nel trattamento dell'MCI (Farina et al., 2012).

Alcuni studi hanno inoltre valutato l'effetto dello stile di vita e terapie non farmacologiche nel ridurre il tasso di progressione da MCI a demenza. Una revisione sistematica di 71 studi con più di cinquemila partecipanti ha esaminato l'efficacia degli interventi di esercizio fisico in pazienti con demenza e MCI. I risultati si sono dimostrati incoraggianti: l'esercizio multicomponente (per esempio lettura di brani, comprensioni di testi, esercizi di logica, esercizio fisico) tende ad essere più efficace nel proteggere la cognizione globale e le funzioni esecutive nei pazienti con MCI (Xiuxiu et al., 2022). Dai dati emerge, quindi, che l'esercizio fisico come terapia non farmacologica possa rappresentare il tipo di esercizio ottimale per rallentare la progressione del declino cognitivo. Tuttavia i dati a disposizione in letteratura sono pochi e molto vari con la necessità di dover approfondire questo argomento.

1.2 Principi e metodologia TMS-EEG

La stimolazione magnetica transcranica (*Transcranial Magnetic Stimulation*, TMS) è una tecnica di neuromodulazione non invasiva efficace nello studio neurofisiologico della corteccia cerebrale. Negli ultimi cinquant'anni, questa metodica è stata ampiamente utilizzata nello studio dei meccanismi fisiopatologici di diversi disturbi neuropsichiatrici. Il primo sforzo per combinare la TMS con l'elettroencefalografia (EEG) risale al 1989 da Roger Q. Cracco, Paul J. Maccabee e J. Cracco e successivamente da Vahe E. Amassian. Tuttavia, nei primi studi di TMS-EEG, la risposta corticale alla stimolazione magnetica e registrata tramite EEG era largamente contaminata dall'artefatto elettromagnetico indotto da TMS.

Dovettero passare alcuni anni prima che il problema degli artefatti elettromagnetici fossero parzialmente risolti. Nel 1996, il primo studio TMS-EEG di successo ha dimostrato la fattibilità nella combinazione delle due tecniche nella valutazione dell'eccitabilità e della connettività corticale. Dopo queste prime registrazioni di successo, l'interesse dell'EEG per misurare l'attivazione cerebrale provocata dalla TMS è costantemente aumentato.

Di conseguenza, ciò ha aperto nuove possibilità nella ricerca di base e clinica. Dopo anni di innumerevoli prove sono stati sviluppati molteplici nuovi approcci alla registrazione TMS-EEG e alle procedure di analisi dei segnali corticali. La mancanza di standardizzazione può influire sulla riproducibilità e limitare la comparabilità dei risultati prodotti in diversi laboratori di ricerca.

1.2.1 Storia

La TMS è una metodica innovativa e resa un promettente strumento di analisi delle funzioni cognitive superiori e della via motoria centrale rendendo possibile l'esplorazione dell'eccitabilità e della conduzione motoria. Nel corso della storia molti sono stati i protagonisti e le scoperte che hanno coinvolto la TMS.

Nel 1831 Michael Faraday al Royal Institute of Great Britain descrisse per la prima volta il fenomeno dell'induzione elettromagnetica e tale scoperta fu la più rilevante per la stimolazione magnetica. Dalla scoperta di Faraday del 1831 bisogna poi attendere il 1896 per trovare la descrizione dei fosfeni, lampi di luce percepiti da un soggetto nel campo visivo, di cui per primo ha parlato il medico D'Arsonval. Non si sa se questo effetto fosse dovuto a una stimolazione diretta della retina o della corteccia visiva poiché la bobina che D'Arsonval utilizzò era molto grande. Il soggetto infatti doveva inserire la testa dentro un grande contenitore.

È nel 1870 che Fritz e Hitzig scoprirono come nel cane, previa craniotomia, la stimolazione elettrica di parti della corteccia provocava la contrazione dei muscoli dell'emisoma controlaterale alla stimolazione ed è cinque anni dopo che Ferrier estese queste osservazioni alla scimmia.

Dovettero passare più di 40 anni perché Leyton e Sherrington osservino che nei primati gli effetti motori a breve latenza si ottengono con la stimolazione del giro precentrale. Nel 1950, Penfield e Rasmussen stimolarono direttamente la corteccia motoria dell'uomo ricostruendo la mappa dell'*homunculus* e determinando la localizzazione e la funzione delle aree premotorie.

Da metà anni '60 in poi, le scoperte si sono susseguite a grande velocità. Bickford e Fremming dimostrarono la stimolazione magnetica non-invasiva dei nervi facciali con molti effetti collaterali, in primis il dolore.

Negli anni '70 Merton e Morton misero a punto uno stimolatore elettrico che eccitava le aree motorie del cervello umano a scalpo intatto tramite l'erogazione di brevi impulsi elettrici ad elevata

intensità. Si ottenne, così, una risposta del muscolo sincrona allo shock elettrico, chiamato potenziale evocato motorio (PEM).

Nel 1982 Polson e colleghi costruirono uno stimolatore magnetico capace di stimolare a livello periferico e di registrare il potenziale evocato muscolare.

Nel 1985 Barker e il gruppo dell'Università di Sheffield misero a punto il primo stimolatore magnetico che risultava non invasivo e con pochi effetti collaterali.

1.2.2 Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS)

La TMS utilizza campi magnetici a rapida variazione e brevissima durata erogati su precise aree dello scalpo per attivare la corteccia cerebrale con una risoluzione temporale inferiore al millisecondo ed una risoluzione spaziale inferiore al centimetro.

Un forte campo magnetico dato da una bobina (*coil*) induce un campo elettrico variabile nella corteccia cerebrale. A seconda dell'orientamento del campo elettrico rispetto alla geometria della corteccia e dei neuroni corticali, viene generata una depolarizzazione nell'area del cervello stimolata. In base al livello di depolarizzazione possono essere generati potenziali d'azione che inducono attivazioni post-sinaptiche nell'albero dendritico delle cellule piramidali corticali che possono sommarsi sia spazialmente che temporalmente. Se il potenziale è sufficientemente ampio, può essere registrato tramite EEG.

La TMS si basa sull'induzione elettromagnetica descritta per la prima volta da Michael Faraday intorno alla metà del diciannovesimo secolo. Questi avvolse due bobine su un anello e trovò che ogni volta che il *coil* (un anello di filo di rame), era connesso o disconnesso a una batteria da un lato, una corrente elettrica gli passava attraverso dall'altro lato: l'anello di rame svolgeva, in questo modo, il ruolo di canale collegando le due bobine attraverso il campo magnetico.

Da questa osservazione trae origine il principio di “*mutua induzione*” secondo cui il circuito elettrico primario determina, attraverso la produzione di un campo magnetico, una corrente indotta in un circuito secondario adiacente. Un impulso TMS viene avviato facendo scorrere un'elevatissima quantità di corrente (5-6000 A) all'interno della bobina TMS. Questa corrente genera un campo magnetico di breve durata (180-800 μ sec) che induce, a sua volta, nel cervello un campo elettrico. All'interno del cervello essendo un conduttore, si generano “correnti parassite” ovvero correnti che circolano in direzione opposta rispetto alle correnti della bobina responsabili poi della depolarizzazione neuronale. La forza dell'impulso è di norma tra 1 e 3 Tesla con un tempo di risalita di circa 50-100 microsecondi. La risoluzione temporale della TMS è inferiore al millisecondo il che consente la modulazione in tempo reale dell'attività cerebrale, rispetto ad altre metodiche che hanno risoluzioni temporali sull'ordine dei secondi. L'estensione spaziale dell'area

corticale stimolata dalla TMS dipende dalla geometria della bobina, dall'intensità dello stimolo erogato, dall'area target e dalla distanza bobina-corteccia.

La TMS stimola maggiormente gli strati superficiali corticali rispetto a quelli più profondi e se l'intensità di stimolazione è adeguata i potenziali d'azione possono propagarsi lungo tutte le connessioni anatomiche ed attivare intere reti neurali specifiche (Hernandez-Pavon et al., 2023) (figura 1).

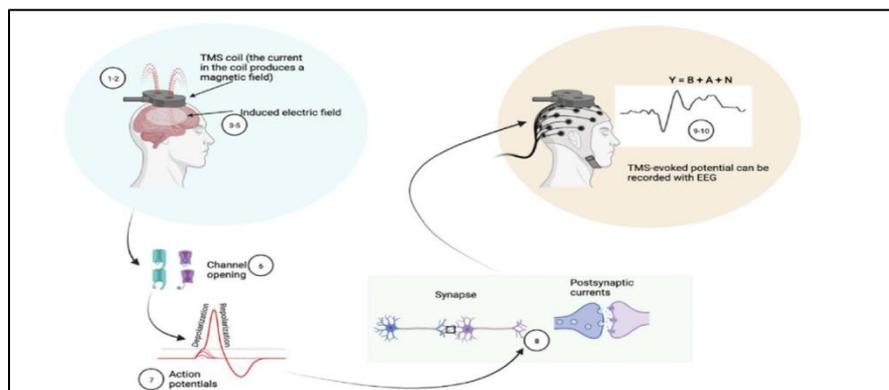


Figura 1. Eventi indotti dalla TMS. Una corrente elettrica scorre attraverso il coil e genera un campo magnetico che induce, a sua volta, un campo elettrico nel cervello determinando un'attivazione neuronale. (Tratto da: J.C. Hernandez-Pavon et al, 2023)

La capacità della TMS di attivare indirettamente strutture cerebrali interconnesse sinapticamente con l'area corticale stimolata viene sfruttata negli studi di connettività cerebrale. La TMS è considerata un importante e promettente strumento d'analisi delle funzioni corticali superiori ed in particolare della via motoria centrale ove permette di isolare e quantificare la proiezione corticospinale. Ciò rende possibile l'esplorazione dell'eccitabilità e della conduzione motoria. Quando la stimolazione viene applicata a livello della corteccia motoria primaria (M1), è possibile generare un potenziale evocato motorio o PEM a livello di muscoli target (principalmente muscolo abduktore del quinto dito della mano, primo interosseo dorsale per gli arti superiori e tibiale anteriore per gli arti inferiori) dell'arto controlaterale alla M1 stimolata, che possono essere registrati tramite elettrodi di superficie. La morfologia e l'ampiezza dei PEM è simile a quella del potenziale d'azione muscolare (*Compound Muscle Action Potential*, CMAP) ottenuto da stimolazione elettrica diretta di un nervo periferico motorio o misto. I PEM sono caratterizzati da un primo potenziale di voltaggio compreso tra 0.1 e 10 mV, seguito da due o tre piccole onde di bassa ampiezza. Dei PEM vengono valutati:

- Latenza: l'intervallo di tempo tra la somministrazione dello stimolo e la prima deflessione stabile rispetto alla linea isoelettrica;
- Ampiezza: misurata da picco a picco o come variazione percentuale rispetto a quella del potenziale corrispondente (nel soggetto sano l'ampiezza del PEM è in genere compresa tra il

20% e l'80% del potenziale muscolare massimale corrispondente, ottenuto con stimolazione sovramassimale del nervo periferico);

1.2.3 Area motoria M1

Con la TMS stimoliamo di fatto l'area motoria primaria o M1 e si rende, pertanto, necessario un approfondimento anatomico.

Nel 1917 Leyton e Sherrington scoprirono che nel primate gli effetti motori a più breve latenza si ottengono per stimolazione del giro precentrale o area 4 di Brodman o corteccia motoria primaria (M1). La corteccia motoria è quella parte del cervello coinvolta nei processi di pianificazione, controllo e esecuzione dei movimenti volontari del corpo. La corteccia motoria si trova nella parte superiore del lobo frontale, nella regione caudale della circonvoluzione frontale ascendente di fronte al solco centrale (figura 2).



Figura 2. Area motoria M1, evidenziata in rosso. fMRI in paziente sano. (Tratto da: Socrates fMRI stimulus software, www.socrates-fmri.com).

La corteccia motoria può essere suddivisa in:

- Corteccia motoria primaria (M1)

Essa controlla direttamente l'esecuzione dei movimenti. L'area M1 corrisponde all'area 4 di Brodman, giro precentrale nella circonvoluzione frontale ascendente. A livello citoarchitettonico, questa corteccia è divisibile in sei strati, tra cui il quinto strato, chiamato strato piramidale interno poiché contiene i neuroni piramidali giganti, o cellule di Betz, provvisti di un lungo assone che penetra nella sostanza bianca del midollo spinale e causa la contrazione degli organi effettori. L'area 4 presenta una mappa funzionale, *homunculus*, ordinata del corpo in cui sono presenti le aree coinvolte nella pianificazione e nell'esecuzione del movimento. Nell'*homunculus* le diverse aree del corpo sono rappresentate in relazione all'estensione dell'area corticale dedicata e non alle reali dimensioni della parte anatomica, dando origine quindi a una rappresentazione distorta, in cui le parti deputate all'elaborazione di movimenti complicati e complessi sono maggiormente

rappresentate.

In circa la metà dei neuroni dell'area 4 l'attivazione avviene per specifici movimenti, indipendentemente da quali muscoli siano utilizzati. Una frazione minore dei neuroni si attiva invece in modo specifico per i muscoli utilizzati. Quindi, nell'area 4 sono rappresentati sia i movimenti sia, in misura minore, i muscoli. Dunque, i neuroni presenti in questa area cerebrale sono connessi direttamente e in maniera selettiva con l'attività dei motoneuroni del midollo spinale.

- Corteccia motoria secondaria (M2) che è a sua volta divisa in:

Corteccia premotoria, che è situata lateralmente sulla superficie esterna del lobo frontale, anteriormente all'area M1. Essa organizza il movimento dei muscoli prossimali e del tronco e contribuisce alla creazione di schemi in base alla direzione degli stimoli esterni. La corteccia premotoria agisce sulla M1 o direttamente sugli organi effettori attraverso i motoneuroni; la corteccia premotoria corrisponde all'area 6 di Brodman, e si trova sulla superficie laterale dell'emisfero.

Area motoria supplementare (SMA), situata sulla faccia mediale del lobo frontale, nel giro del cingolo. Essa presiede alla coordinazione e alla pianificazione dei movimenti complessi o alla coordinazione dei movimenti degli arti distali. L'area motoria supplementare è localizzata sulla estensione mediale dell'area 6 verso la linea mediana dell'emisfero.

Generalmente, la corteccia premotoria comprende quattro sezioni. Le due aree principali sono la corteccia premotoria superiore (dorsale) e inferiore (ventrale), ognuna di queste aree è poi ulteriormente divisa in una sub-regione vicina alla parte anteriore del cervello, corteccia premotoria rostrale e una sub-regione vicina alla parte posteriore del cervello, corteccia premotoria caudale.

La stimolazione dell'area 6 di Brodman induce la contrazione di vari gruppi di muscoli in entrambe le parti del corpo, dimostrando che quest'area è sovraordinata rispetto all'area 4.

L'area 6 di Brodman gioca un ruolo estremamente importante nella pianificazione di sequenze motorie complesse. I neuroni localizzati in queste aree si attivano prima dell'esecuzione di movimenti complessi, mentre l'esecuzione di movimenti semplici non è preceduta da attivazioni dell'area 6 ma solo dell'area 4.

A livello dell'area premotoria sono presenti i "neuroni specchio" ossia quei neuroni la cui attivazione avviene quando si esegue un certo atto motorio, o quando si osserva un gesto. I neuroni specchio sono coinvolti nel coglierne le intenzioni e le implicazioni sociali delle azioni, così come nei processi di riconoscimento emotivo e di empatia. Inoltre, essi rivestono un importante ruolo nell'apprendimento per imitazione, in cui grazie all'osservazione, nel cervello si imprimono un repertorio di emozioni e di comportamenti sociali. (Fiore F., 2017)

1.2.4 Elettroencefalografia (EEG)

L'elettroencefalogramma (EEG) è una tecnica neurofisiologica non invasiva che consiste nell'applicazione di elettrodi registranti sullo scalpo che permettono la registrazione dell'attività elettrica della corteccia cerebrale. In particolare, misura differenze di potenziale di campo elettrico tra coppie di elettrodi (bipolare) o tra ciascun elettrodo rispetto ad una referenza (unipolare).

Fu Hans Berger nel 1924, medico psichiatra tedesco, a registrare il primo EEG, e la registrazione venne poi perfezionata da Herbert Jasper qualche anno dopo, ma da allora i principi di base di questa metodica sono rimasti invariati. Il segnale elettrico registrato dall'EEG è generato dalla sommazione spaziale e temporale di correnti ioniche extracellulari nella membrana dei dendriti apicali dei neuroni piramidali a livello degli strati superficiali della corteccia cerebrale. I corpi cellulari di questi neuroni si trovano negli strati corticali IV-V e sono disposti in "palizzate" parallele tra loro e perpendicolari alla superficie della corteccia cerebrale (Beniczky et al., 2020).

Il segnale EEG è principalmente prodotto dalla sincronizzazione di potenziali postsinaptici eccitatori (*Excitatory Post-synaptic Potentials*, EPSP) dei neuroni corticali. Un neurone dev'essere depolarizzato fino a soglia (-55mV) per produrre un potenziale d'azione. Ogni modificazione del voltaggio predispone il neurone a generare un potenziale postsinaptico eccitatorio che è solitamente determinato da un ingresso nella cellula di ioni sodio che annullano parte della carica negativa del versante interno della membrana. In altri casi, un neurotrasmettitore iperpolarizza la cellula postsinaptica rendendola meno predisposta a inviare un impulso e questo si definisce potenziale postsinaptico inibitorio (*Inhibitory Post-synaptic Potentials*, IPSP). Un IPSP è spesso dovuto all'ingresso di ioni cloro nella cellula o dalla diffusione del potassio fuori dalla cellula (Saladin - Piccin, 2011). (figura 3).

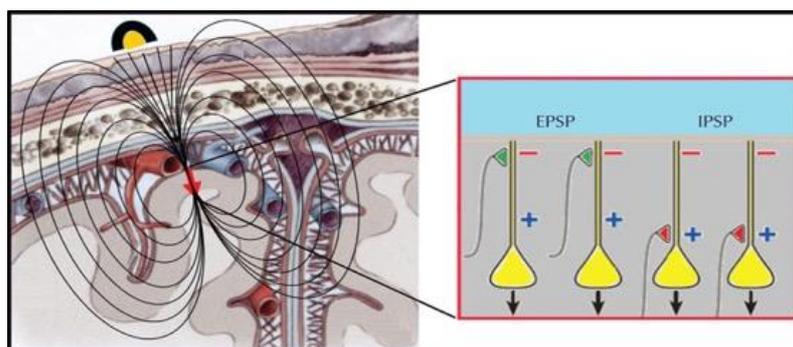


Figura 3. Origine dei segnali EEG. (Tratto da: Beniczky et al., *Electroencephalography: basic biophysical and technological aspects important for clinical applications*).

L'attività registrata dal cuoio capelluto è la somma di due processi: la conduzione di volume e la propagazione. La conduzione di volume è un fenomeno non energia-dipendente mentre la propagazione è un meccanismo attivo che dipende dall'energia. Secondo la teoria della conduzione

di volume, la testa è un conduttore di volume tridimensionale attraverso il quale l'attività elettrica si diffonde istantaneamente dal generatore. La conduzione è molto veloce, e un elettrodo posizionato ad una certa distanza registrerà ugualmente l'attività sincrona con il generatore. Pur mantenendo la polarità e la morfologia originarie, la forma d'onda si attenua progressivamente in ampiezza di un fattore direttamente proporzionale al quadrato della distanza dal suo generatore.

Nella propagazione, invece, la forma d'onda appare in una posizione distante dopo un intervallo di tempo, ma la polarità e la morfologia possono subire una certa distorsione (Seneviratne U., 2023).

I potenziali d'azione non sono i responsabili della genesi dell'EEG per due motivi principali: 1) l'ampiezza del campo elettrico prodotto dalla propagazione di un potenziale d'azione diminuisce più rapidamente dell'ampiezza dei campi prodotti dai potenziali postsinaptici; 2) la durata è molto breve, dell'ordine di 1ms, tempo insufficiente per ottenere un'adeguata sincronizzazione di ampie popolazioni neuronali corticali (Meccarelli O., 2021).

L'attività che di regola viene registrata in condizioni di veglia rilassata consiste in una oscillazione del potenziale elettrico con una frequenza tra 8-13Hz, più evidente sulle regioni posteriori dello scalpo denominata attività *alpha* (α). Nelle regioni anteriori l'attività registrata in condizioni basali è più rapida sopra ai 13Hz, attività in banda *beta* (β). Ritmi più lenti, tra 4 e 8Hz, banda *theta* (θ) e inferiori a 4Hz, banda *delta* (δ) compaiono durante il sonno o in determinate condizioni patologiche che compromettono la funzionalità della corteccia e delle strutture sottostanti.

L'interfaccia tra cervello e apparecchiature di registrazione del segnale bioelettrico è costituita da elettrodi in grado di rilevare il potenziale di campo elettrico. Per garantire la stabilità di tale interfaccia, l'elettrodo deve garantire un contatto stabile e duraturo con la cute ed aderire ad una superficie circoscritta al fine di evitare dispersioni.

Esistono varie tipologie di elettrodi:

- Elettrodi a coppetta fissati sullo scalpo: realizzati generalmente in argento rivestito da cloruro d'argento (AgCl), in stagno o oro di diametro variabile da 0,1 a 1 cm;
- Cuffie con elettrodi premontati: il tipo di elettrodo è analogo ai precedenti, ma gli elettrodi sono mantenuti in posizione tramite una cuffia elasticizzata che si adatta facilmente alla fisionomia cranica del paziente;
- Elettrodi ad ago ipodermici: consistono in aghi di acciaio o platino non clorurati di lunghezza variabile da 1 a 2 cm, di diametro pari a circa 1 mm, ed eventualmente ricurvi ad uncino, inseriti sottocute. A causa della loro invasività vengono utilizzati quasi esclusivamente in corso di interventi chirurgici o in pazienti in stato di coma.

Il montaggio degli elettrodi EEG avviene con il *Sistema Internazionale 10-20* e secondo questo schema i punti di contatto elettrodo-scalpo corrispondono a distanze pari al 10% e al 20% della lunghezza di linee ideali di riferimento che congiungono punti predefiniti del cranio e si incontrano in un punto immaginario definito vertice. Sono state proposte alcune varianti per il posizionamento degli elettrodi, al fine di garantire il montaggio di un numero maggiore di elettrodi. Questi sistemi vengono utilizzati principalmente in ambito di ricerca, e sono il *sistema internazionale 10-10* che consente di posizionare fino a 75 elettrodi ed il *sistema internazionale 10-5* che consente di individuare fino a 300 elettrodi.

Il segnale elettroencefalografico è rappresentato dalla differenza di potenziale elettrico tra un elettrodo attivo registrante, posto sopra la sede dove si svolge l'attività neuronale e un elettrodo, teoricamente, indifferente (REF). Ciascuna coppia di elettrodi è inoltre collegata a un elettrodo di terra per ridurre al minimo la frequenza di rete a 50 Hz (nelle registrazioni di routine, solitamente viene posizionato nella zona della metà della fronte). Oltre al posizionamento degli elettrodi sullo scalpo, sono fondamentali la combinazione degli elettrodi e la modalità di collegamento al sistema di acquisizione (montaggi o derivazioni). In referenza comune (*Common Reference, CR*) ogni elettrodo dello scalpo viene riferito a un elettrodo comune che dovrebbe essere localizzato in un punto neutro dal punto di vista elettrico per non contaminare il segnale biologico originario. Nel montaggio a referenza media (*Common Average Reference, AVG*) la referenza è considerata come il potenziale medio di tutti gli elettrodi: i potenziali dei singoli elettrodi sono misurati rispetto ad un valore medio istantaneo, ottenuto sommando tra di loro tutti i potenziali degli elettrodi applicati. Nelle derivazioni bipolari, la differenza di potenziale è calcolata tra coppie di elettrodi, posti lungo catene in cui un elettrodo è in comune tra due canali successivi. Il potenziale letto è di bassissima entità, circa 5-200 μV ed ha bisogno di un sistema di amplificazione del segnale per poter essere tradotto in numero da un convertitore analogico-digitale negli elettroencefalografi digitali. La conversione analogico-digitale è un processo che, dato un segnale continuo (in forma analogica), lo converte in un segnale digitale, ovvero una sequenza di numeri, che diventano a quel punto facilmente gestibili e memorizzabili da un calcolatore. L'amplificazione comporta l'introduzione di un artefatto, chiamato "rumore", non eliminabile e legato al circuito elettrico che costituisce l'amplificatore e deve essere minimizzato per non contaminare il segnale biologico (Angelini-Battistin, 2022). Dal segnale ottenuto è necessario rimuovere attività artefattuali indesiderate a specifiche frequenze con l'uso di filtri: dispositivi interni all'amplificatore in grado di ripulire il segnale biologico elettroencefalografico. Nella pratica clinica si usano tre filtri: 1) filtro passa alto (*high-pass filter*) che attenua le basse frequenze, per esempio, generate dal movimento degli elettrodi a causa della sudorazione del paziente; 2) filtro passa basso (*low-pass filter*) per attenuare le rapide frequenze, per esempio, generate dall'attività muscolare del paziente e infine 3) un filtro

notch che elimina la componente a 50/60 Hz derivante dalla contaminazione del segnale da parte della corrente alternata della rete elettrica.

L'EEG ha un'alta risoluzione temporale (nell'ordine dei millisecondi) ma una bassa risoluzione spaziale, che può essere aumentata utilizzando un numero maggiore di elettrodi registranti, aumentando di conseguenza la definizione topografica della fonte del segnale EEG.

1.2.5 TMS-EEG

Negli ultimi 20 anni, la combinazione di TMS ed EEG ha consentito lo studio neurofisiologico non invasivo gli stati cerebrali e la loro dinamica attraverso le aree corticali motorie e non motorie, compreso l'esame delle interazioni cortico-corticali su una scala temporale di millisecondi, di meccanismi di plasticità e interazioni tra meccanismi eccitatori ed inibitori intra- ed inter-corticali (Komssi et al., 2006). La registrazione dell'attività elettrica corticale tramite EEG durante l'erogazione di stimoli TMS consente la valutazione della reattività corticale a livello dell'area stimolata e di aree distanti dal sito di stimolazione, permettendo di complementare le informazioni casuali fornite dalla TMS con le informazioni di tipo correlazionale dei dati EEG. Uno dei principali vantaggi dell'uso combinato della TMS-EEG è la possibilità di utilizzare le risposte ottenute come *marker* neurofisiologici di eccitabilità o connettività corticale in condizioni fisiologiche e patologiche. La maggior parte degli studi TMS-EEG è stata focalizzata sull'analisi delle risposte EEG evocate dalla stimolazione TMS i cosiddetti Potenziali Evocati da TMS (*Transcranial Evoked Potentials*, TEPs) in seguito a stimolazione della M1. La corteccia motoria è fisiologicamente coinvolta nell'esecuzione dei movimenti volontari del corpo. Essa si trova nella parte posteriore del lobo frontale, nella regione caudale della circonvoluzione frontale ascendente, anteriormente al solco centrale come citato precedentemente. La M1 presenta un'organizzazione somatotopica, in cui gruppi muscolari sinergici sono rappresentati secondo un gradiente medio-laterale che definisce una "mappa funzionale" ideale definita *homunculus* motorio, in cui le diverse regioni corporee sono rappresentate in senso cranio-caudale come definito sopra. La stimolazione TMS di diverse porzioni della M1 consente quindi il reclutamento parcellare di gruppi muscolari. La strumentazione (figura 4) per acquisire il segnale TMS-EEG include alcuni accorgimenti tecnici e strumentali, che includono l'utilizzo di:

- Amplificatori EEG compatibili con TMS: dispositivi che permettono di amplificare il segnale elettroencefalografico. Gli attuali amplificatori accoppiati a corrente continua (CC), al contrario dei precedenti in corrente alternata (CA) consentono alla prolungata deflessione negativa causata dall'impulso TMS di tornare immediatamente a un intervallo lineare dopo la stimolazione. L'attuale uso di amplificatori con elevate frequenze di campionamento (> 5kHz) offre l'opportunità per una caratterizzazione dettagliata e completa dell'artefatto da

TMS, che può essere rimosso *offline* durante le analisi post-procedura;

- Elettrodi compatibili con TMS: elettrodi di Ag/AgCl o elettrodi ad anello C compatibili con la TMS di solito posizionati in cuffie elasticizzate precablate. Gli elettrodi C vengono generalmente preferiti perché riducono le correnti anomale intraelettrodiche e dunque riducono la contaminazione artefattuale;
- Neuronavigazione: la posizione e l'orientamento della bobina possono essere monitorati in tempo reale tramite l'utilizzo di telecamere dedicate in grado di rilevare gli spostamenti di marcatori riflettenti posizionati sulla bobina TMS e sulla fronte del soggetto, garantendo un'adeguata stimolazione dell'area bersaglio, durante la sessione sperimentale. Si riduce, così, la possibile variabilità *inter-trial* nelle registrazioni TMS-EEG dovuta al movimento della bobina e aumentando, di conseguenza, la precisione delle prove riducendo il rischio di stimolare l'area target in maniera non ottimale o stimolare aree circostanti;
- Bobine: la scelta della bobina dipende dal protocollo TMS da eseguire. La forma, dimensione e avvolgimento delle spire interne determinano il campo elettrico indotto e, quindi la focalità e la profondità di stimolazione che influenzano il volume cerebrale stimolato. La bobina TMS più comune è la bobina a forma di otto, ma esistono studi dell'effetto delle bobine sulle risposte EEG correlate alla TMS.



Figura 4. Strumentazione TMS-EEG. Il sistema di neuronavigazione (A) permette di visualizzare in real-time il sito da stimolare. La stimolazione avviene con coil a farfalla per una maggior focalità(B). Il segnale EEG è registrato da elettrodi inseriti su una cuffia elasticizzata e posta sullo scalpo del soggetto (C). Gli amplificatori di nuova generazione consentono di registrare il segnale senza interferenza dello stimolo TMS (D).

(Adattato da: M. Massimini, et al., rt-TSP: an informative tool for optimal experimental control and computation of PCI in Realtime. University of Milan, Biomedical and Clinical Science “L. Sacco”. 2022)

1.2.6 Artefatti

La TMS-EEG non è esente da contaminazione artefattuale del segnale registrato e la rimozione degli artefatti rappresenta un momento fondamentale nell'analisi e nell'interpretazione dei TEPs. Gli artefatti possono essere classificati in due gruppi: artefatti non fisiologici e artefatti fisiologici.

Gli artefatti non fisiologici derivano dalla strumentazione e comprende:

- Artefatto elettromagnetico: è prodotto dalla forza elettromotrice indotta nelle spire degli elettrodi EEG. Tale artefatto è in grado di saturare gli amplificatori e mascherare il segnale EEG registrato durante l'erogazione dello stimolo TMS. Questo artefatto non può essere eliminato interamente nonostante siano disponibili sistemi EEG con amplificatori adeguati all'uso con TMS, in grado di minimizzarlo;
- Artefatto da ricarica TMS: si verifica quando i condensatori che immagazzinano la corrente elettrica necessaria per la TMS vengono ricaricati. Spesso può essere confuso con un segnale fisiologico cerebrale;
- Artefatto da movimento degli elettrodi: dovuto al contatto dell'elettrodo con la bobina da TMS o i movimenti della bobina durante la stimolazione o il tocco degli elettrodi da parte dell'operatore. Questo artefatto può essere parzialmente eliminato con l'applicazione di un separatore in schiuma posto tra la bobina e gli elettrodi.

Gli artefatti fisiologici derivano dal paziente e comprendono:

- Artefatti da movimenti oculari e ammiccamento (*blink*): si verificano spontaneamente e sono molto comuni anche nelle registrazioni EEG standard. Possono essere indotti dal *click* della bobina e possono essere parzialmente prevenuti informando il paziente e con l'abituazione allo stimolo acustico;
- Artefatti muscolari: possono essere spontanei o causati dall'impulso TMS che provoca una contrazione dei muscoli facciali con forte contaminazione del segnale EEG. Si tratta di attività ad alta frequenza e generalmente con localizzazioni spaziali caratteristiche (ad esempio a livello fronto-polare per i muscoli masticatori, diffusi per gli atti deglutitori). Una soluzione pratica è spostare o modificare l'orientamento del coil TMS quando risulta possibile;
- Artefatti uditivi e somatosensoriali: gli artefatti uditivi sono dovuti ai click prodotti dalla bobina TMS, che provocano un potenziale evocato uditivo. Tale artefatto è risolvibile con l'applicazione di un rumore di mascheramento prodotto attraverso cuffiette o con tappi auricolari. Il contatto della bobina con lo scalpo può invece indurre un potenziale somatosensoriale risolvibile posizionando uno spaziatore in schiuma al di sotto della bobina.

1.3 Potenziali Evocati da TMS (TEPs)

I potenziali evocati da TMS (TEPs) sono potenziali elettrici cerebrali che consentono di studiare l'eccitabilità e la reattività corticale. I TEPs presentano una morfologia complessa composta da una serie di picchi e avvallamenti a specifiche latenze, con una durata pari a circa 400-500ms. I TEPs sono costituiti da deflessioni positive (P) e negative (N) che riflettono la sovrapposizione spaziotemporale di potenziali postsinaptici eccitatori e inibitori indotti dallo stimolo TMS in diverse strutture cerebrali. In particolare, la stimolazione di diverse aree produce TEPs con caratteristiche diverse in termini di morfologia (numero e latenza delle diverse componenti) a livello dell'area corticale stimolata e delle aree circostanti. I TEPs sono stati caratterizzati in seguito alla stimolazione di diverse regioni corticali, di cui la regione più studiata è la M1.

Un singolo stimolo TMS erogato sulla M1 è in grado di produrre TEPs caratterizzati da almeno sei componenti elettroencefalografiche evocate e denominate in base alla loro polarità (positiva o negativa), seguita da un numero che indica la loro latenza modale in millisecondi (figura 5):

- **N15**: si verifica un potenziale elettrico di ampia polarità negativa localizzato sotto il coil che 2ms dopo si evolve in un dipolo elettrico positivo anteriormente e negativo posteriormente al sito di stimolo;
- **P30**: ampio potenziale positivo centrato al vertice;
- **N45**: dipolo sul sito di stimolo negativo anteriormente e positivo posteriormente;
- **P60**: ampio potenziale positivo fronto-centrale;
- **N100**: diffusa negatività ipsilaterale allo stimolo;
- **P180**: compare ampio potenziale positivo localizzato sulle regioni frontocentrali controlaterali all'emisfero stimolato.

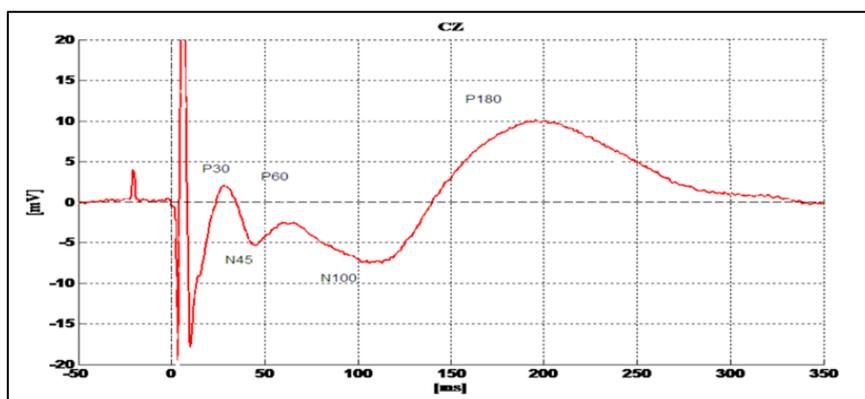


Figura 5. Grafico dei potenziali evocati da TMS (TEPs) in relazione a latenza e ampiezza. Stimolazione di M1 in soggetto sano. (Tratto da: Tremblay S. et al., Clinical utility and prospective of TMS-EEG).

Le diverse componenti dei TEPs dell'area M1 possono essere rappresentate spazialmente con mappe topografiche con colori che rappresentano i voltaggi positivi, colorati in rosso, e voltaggi negativi colorati in blu e la loro distribuzione a livello dello scalpo (figura 6).

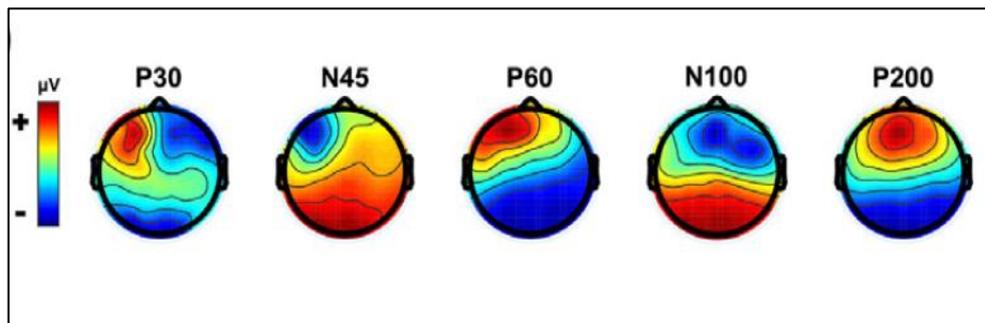


Figura 6. Mappa topografica dei TEPs da stimolazione di M1 in soggetto sano. (Tratto da Tremblay S. et al., Clinical utility and prospective of TMS-EEG).

È stato suggerito che la componente P30 coinvolga percorsi tra strutture sottocorticali come nuclei talamici o i gangli della base. È stato dimostrato, invece, che la N100 è correlata in parte alla risposta evocata uditiva prodotta dal suono durante la scarica della bobina e in parte a potenziali reali corticali indotti dalla TMS (Hernandez-Pavon et al. 2023).

Sono stati segnalati altri due ulteriori picchi di breve latenza ovvero N7 e P13, ma spesso nella maggioranza degli studi non sono nettamente distinguibili e tantomeno identificati (Ferreri et al., 2013).

I TEPs possono essere registrati sia localmente che negli elettrodi distali, consentendo lo studio della diffusione dell'attivazione sulle aree corticali e sono sensibili, non solo, all'intensità della stimolazione, ma anche all'orientamento del *coil* e quindi alla direzione della corrente indotta nel cervello. I TEPs sono anche sensibili allo stato di vigilanza e al sito corticale di stimolazione. È utile segnalare che oltre a M1, i TEPs sono ben caratterizzati nella corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC), i quali mostrano picchi a diverse latenze (P25, N40, P60, N100, P185) con risposte generalmente inferiori a M1. È ormai noto che i TEPs ottenuti tramite stimolazione TMS di aree corticali non motorie mostrano ampiezze tipicamente inferiori rispetto a M1 (Tremblay et al., 2019). Altre regioni cerebrali come per esempio la corteccia parietale, la corteccia temporo-occipitale, la corteccia occipitale e il cervelletto sono valutate in un numero minore di studi e non ci sono dati sufficienti per comprendere la riproducibilità dei picchi. (Farzan et al., 2022).

1.3.1 Studio dei TEPs

Uno degli approcci per lo studio delle caratteristiche dei TEPs è la misurazione dell'ampiezza e della latenza dei picchi TEPs registrati da singoli elettrodi EEG di interesse. I dati sono tipicamente presentati come una forma d'onda di ampiezza variabile in funzione del tempo.

Un metodo alternativo alla misurazione dell'area sotto la curva (integrale) del segnale rettificato o della deviazione standard a livello dell'elettrodo di interesse specifico in un dato momento corrispondente ai picchi del TEPs è definita come potenza di campo medio locale (*Local Mean Field Power*, LMFP). Lo svantaggio di questo approccio è che non tiene conto della polarità del segnale che, invece, potrebbe fornire informazioni molto importanti sulla natura della sorgente sottostante.

Una ulteriore alternativa è la valutazione dell'attività registrata da specifici elettrodi di interesse e consiste nella misurazione della potenza di campo medio globale (*Global Mean Field Power*, GMFP) che riflette l'attività EEG evocata dell'impulso TMS registrata da tutti gli elettrodi e che viene calcolata come il segnale medio evocato su tutti gli elettrodi.

Ognuno di questi metodi presenta dei vantaggi e degli svantaggi ma consente di tracciare un ritratto diverso dei TEPs e la scelta del metodo dipende fortemente dall'obiettivo dello studio e dall'ipotesi sperimentale iniziale.

Quando l'EEG viene registrato contemporaneamente all'applicazione TMS, ci sono numerosi fonti artefattuali come ampiamente trattato precedentemente. Vengono utilizzate diverse strategie per rimuovere ciascuna fonte di artefatto e garantire che i TEP siano correlati ai processi fisiologici previsti. I metodi utilizzati per scoprire i TEP includono strategie *online* e *offline*.

Le strategie *online* sono volte a ridurre al minimo la contaminazione TEP mediante la registrazione degli artefatti della strumentazione. Alcuni esempi sono l'uso di amplificatori specializzati, frequenza di campionamento elevate, impostazioni di filtri selettivi o forme, tipi o disposizioni di elettrodi specializzati. Le strategie *online* includono anche la riduzione al minimo della contaminazione del TEP da parte di artefatti fisiologici. Inoltre, tali strategie consistono nell'aggiunta di condizioni di controllo sperimentale come la stimolazione transcranica finta, un diverso sito di stimolazione, un diverso orientamento della bobina possono essere inclusi durante la sessione di TMS-EEG come condizione di controllo.

Infine, le strategie *offline* includono metodologie utilizzate successivamente alla sessione sperimentale. Queste strategie possono includere l'utilità di algoritmi e *pipeline* di rifiuto degli artefatti, confronti statistici con condizioni di controllo. La valutazione statistica dell'affidabilità può anche fornire ulteriori informazioni sulla riproducibilità delle misure dei risultati dei TEP. (Farzan et al., 2022).

1.3.2 Oscillazioni corticali correlate alla TMS

Le oscillazioni corticali sono state ampiamente studiate nella letteratura EEG e specifiche bande di frequenza sono state associate a specifici comportamenti o funzioni cognitive. Le bande canoniche includono, come citato precedentemente: (1) Delta, (2) Theta, (3) Alpha, (4) Beta, e (5) Gamma che riflette, quest'ultima, circuiti di feedback corticale e attività di interneuroni inibitori a picchi rapidi coinvolti in processi cognitivi superiori.

Le indagini sulle oscillazioni corticali si concentrano sullo studio degli effetti indotti da TMS nel dominio della frequenza, poiché si ritiene che la TMS interagisca con le oscillazioni corticali locali e periferiche. Il valore aggiunto di TMS-EEG nello studio degli effetti indotti da TMS sulle oscillazioni corticali è la possibilità di studiare la specificità dei ritmi cerebrali. Pertanto, TMS-EEG offre l'opportunità di misurare l'attività nelle bande di frequenza evocate direttamente dall'impulso TMS, che è rappresentato come un allineamento di fase transitorio dell'attività oscillatoria.

In questo modo, consente lo studio della frequenza naturale o di risonanza in una regione specifica, riflessa in un breve periodo di sincronizzazione dell'attivazione neuronale a una precisa frequenza dopo l'impulso TMS. D'altra parte, è stato dimostrato che le oscillazioni cerebrali in corso, che probabilmente riflettono uno stato cerebrale momentaneo, determinano le ampiezze PEM evocate dalla TMS. Ad esempio, l'ampiezza PEM è correlata con l'attività pre-TMS nella banda di frequenza β e γ .

Le oscillazioni corticali hanno fornito importanti approfondimenti sugli effetti dei protocolli che inducono plasticità sull'attività cerebrale in soggetti sani, sull'effetto di trattamenti specifici nelle popolazioni cliniche e sul ruolo di una specifica rete oscillatoria nella fisiopatologia dei disturbi clinici. Le caratteristiche oscillatorie evocate dalla TMS in varie regioni del cervello sono state ben definite negli ultimi anni. Ad esempio, nelle regioni non motorie, tra i numerosi parametri che consentono di caratterizzare i TEP, le caratteristiche spettrali della risposta evocata dalla TMS sembrano fornire risultati interessanti e consistenti. Nello specifico, TMS evoca oscillazioni in banda α e θ nelle regioni occipitali, in banda β nelle regioni parietali, oscillazioni in banda β e θ nella corteccia premotoria, e oscillazioni in banda β rapide e γ nelle regioni frontali. (Tremblay S., et al., 2019).

2.0 MATERIALI E METODI

2.1 Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo studio pilota è la valutazione e analisi della morfologia dei TEPs ottenuti tramite stimolazione bilaterale della M1 in soggetti con aMCI, MP-MCI rispetto a un gruppo di soggetti sani di controllo (HC).

Lo studio dei TEPs ci permette, quindi, di definirli come un possibile potenziale *marker* neurofisiologico per distinguere i soggetti con MCI ed eventuali differenze nelle diverse forme cliniche di MCI.

2.2 Popolazione

Sei pazienti affetti da MCI (3 femmine e 3 maschi età mediana 74,5 anni), di cui tre pazienti con MCI amnesico e tre pazienti con MP-MCI sono stati reclutati nel presente studio pilota. Sono stati inoltre inclusi quattro soggetti sani di controllo (una femmina e 3 maschi, età mediana 76 anni). Tutti i partecipanti erano destrimani, hanno ricevuto un punteggio di almeno 18 al Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) e nessuno presentava altre comorbidità neurologiche o psichiatriche.

I pazienti sono stati sottoposti a test neuropsicologici tra cui l'MMSE, il test per la valutazione lo stato cognitivo (*Montreal Cognitive Assessment*, MoCa) una valutazione funzionale tramite la valutazione delle attività della vita quotidiana (*Activity of Daily Living*, ADL) e valutazione dell'autonomia nelle attività strumentali (*Instrumental Activities Daily Living*, IADL). Nessun partecipante assumeva farmaci noti per influenzare l'eccitabilità di M1 o presentava controindicazioni all'uso della TMS secondo le più recenti linee guida internazionali sulla sicurezza della tecnica. (Rossini et al., 2015).

Ciascun soggetto è stato inoltre sottoposto a una risonanza magnetica (RM) cerebrale prima della sessione sperimentale per la ricostruzione 3D e la neuronavigazione necessarie per la TMS.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della Ricerca locale ed è stato condotto in conformità con l'ultima versione della Dichiarazione di Helsinki.

Le caratteristiche demografiche e neuropsicologiche dei partecipanti allo studio sono mostrate nella tabella I.

Tabella I. Caratteristiche demografiche e cliniche dei partecipanti.

Paziente	Sesso	Diagnosi	Età (anni)	Scolarità (anni)	ADL	IADL	MoCA
1	M	MP-MCI	76	8	6	4	23
2	M	MP-MCI	77	10	6	5	19
3	F	MP-MCI	73	8	5	8	21
4	F	aMCI	69	13	6	8	25
5	M	aMCI	82	13	6	8	21
6	F	aMCI	72	18	6	8	20
7	M	HC	73	18	6	8	22
8	M	HC	79	13	6	8	26
9	F	HC	67	8	6	8	26
10	M	HC	81	18	6	5	25

2.3 TMS

La TMS a singolo stimolo è stata erogata tramite un sistema *Nexstim* (Nexstim, Helsinki, Finlandia) connesso a un *coil* a forma di otto (diametro 70mm).

Il *coil* è stato posizionato sopra l'“hot spot” della M1 separatamente per ciascun emisfero, definito come la localizzazione sullo scalpo dove gli stimoli TMS erano in grado di produrre PEM di massima ampiezza e latenza minima nel muscolo I° interosseo dorsale (*First Dorsal Interosseus*, FDI) controlaterale. Le coordinate della testa del soggetto (acquisite tramite un *head tracker* dedicato e posizionato sulla fronte), degli elettrodi e del *coil* sono state determinate e trasferite ad un sistema di coordinate basato su immagini RM pesate in T1 (spessore di acquisizione di 1mm) del soggetto attraverso un sistema di *tracking* 3D ad infrarossi (Polaris, Northern Digital Inc., Waterloo, Canada) (Leodori et al., 2022; Casarotto et al., 2019). Durante l'erogazione degli stimoli TMS, il *coil* è stato mantenuto sull'*hot spot motorio* identificato tramite il sistema di neuronavigazione, in modo da consentire la riproducibilità della stimolazione e ridurre la variabilità dell'acquisizione dei PEM. Gli stimoli TMS sono stati erogati ad un'intensità pari al 120% della soglia motoria a riposo (*Resting Motor Threshold*, RMT) definito come il valore di intensità in grado di elicitare un PEM di ampiezza maggiore di 50 μ V del muscolo target a riposo in almeno il 50% degli stimoli portati all'*hot spot* motorio. La registrazione dei PEM è avvenuta per mezzo di elettrodi di superficie pregellati di pasta conduttiva sul muscolo FDI controlaterale alla M1 stimolata, posizionando l'elettrodo attivo sul ventre muscolare e l'elettrodo di riferimento sul tendine (montaggio *belly-*

tendon), previa pulizia della cute con alcol e pasta sgrassante per minimizzare le impedenze all'interfaccia cute-elettrodo. Il segnale elettromiografico (EMG) è stato acquisito con una frequenza di campionamento pari a 3kHz, impostando una banda passante 10 – 500 Hz, e una risoluzione di 0,3 μ V.

2.4 Registrazione EEG

Per l'acquisizione del segnale EEG è stato utilizzato un sistema compatibile con TMS (NeurOne Tesla, Bittium Biosignals Ltd., Kuopio, Finlandia) consentendo la registrazione continua del segnale senza saturazione del preamplificatore. L'attività EEG è stata acquisita in continuo da 62 elettrodi passivi montati su una cuffia precablata (EASYCAP, Easycap GmbH, Am Anger 5, DE-82237 Woerthsee, Germania) facendo corrispondere perfettamente il canale Cz con il vertice a metà strada tra *nasion* ed *inion* secondo il *Sistema Internazionale 10-10*: Fp1, Fp2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2, F7, F8, T7, T8, P7, P8, Fz, Cz, Pz, Iz, FC1, FC2, CP1, CP2, FC5, FC6, CP5, CP6, TP9, TP10, F1, F2, C1, C2, P1, P2, AF3, AF4, FC3, FC4, CP3, CP4, PO3, PO4, F5, F6, C5, C6, P5, P6, AFz, FCz, FT7, FT8, TP7, TP8, PO7, PO8, Fpz, Cpz, POz, Oz. Sono stati usati elettrodi ad anello a C, premontati nella cuffia Easy Cap, in cui l'Ag/AgCl (argento/argento cloruro) compatibili con TMS. La preparazione degli elettrodi è stata eseguita scostando accuratamente i capelli creando un adeguato alloggiamento per l'elettrodo, che è stato successivamente riempito di pasta elettroconduttrice. L'elettrodo di riferimento è stato posizionato sulla fronte a 2 cm dal *nasion*, fuori della cuffia precablata mentre per l'elettrodo di terra è stato utilizzato l'elettrodo AF7 nella cuffia. L'impedenza tra la cute e ciascun elettrodo EEG è stata valutata dopo il montaggio e mantenuta sotto i 5k Ω .

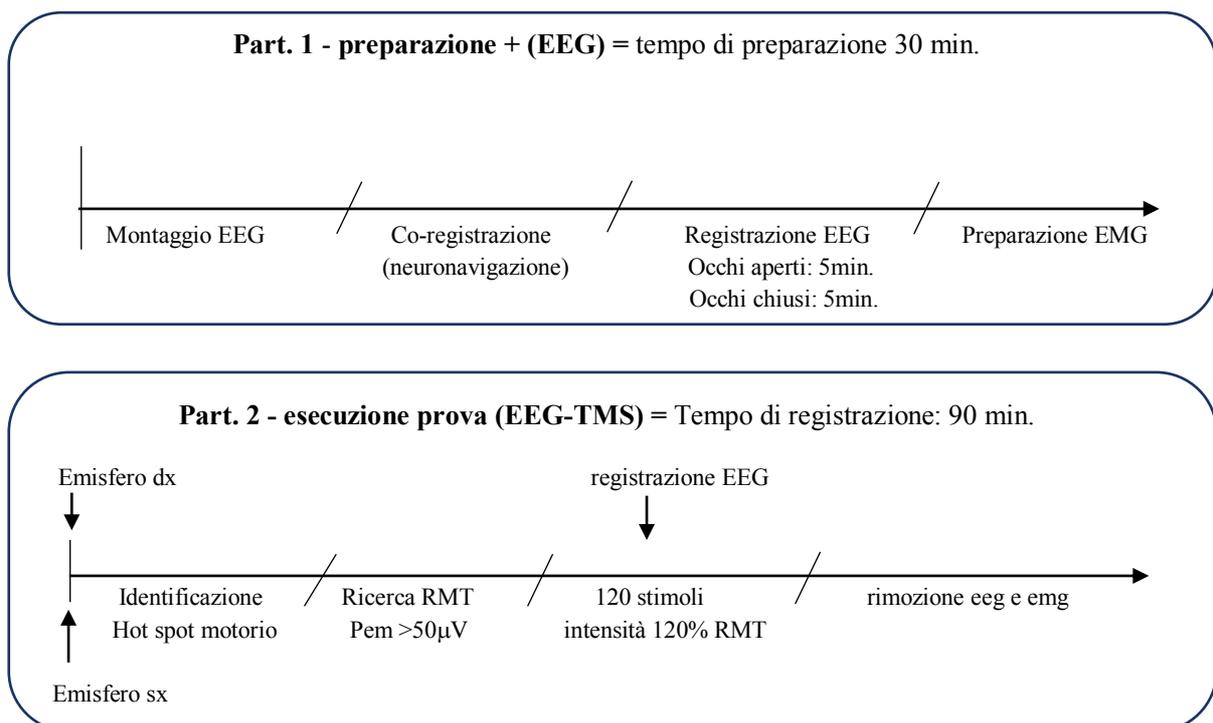
I segnali EEG sono stati acquisiti con una frequenza di campionamento di 5kHz, ed è stato applicato un filtro passa-banda tra 0,1 Hz e 1000 Hz. I movimenti oculari e di ammiccamento sono stati rilevati posizionando una coppia di elettrodi ad anello compatibili con TMS in Ag/AgCl (*Elettrooculogramma*, EOG) posizionati sul margine latero-superiore e latero-inferiore dell'occhio destro o sinistro, previa pulizia della cute con alcol e pasta sgrassante e mantenuti in sede per mezzo di un cerotto.

2.5 Protocollo sperimentale

Tutte le sessioni sperimentali si sono state svolte presso la Clinica di Neurologia dell'Ospedale Universitario di Padova. Le singole RM necessarie per la ricostruzione e la navigazione 3D sono state acquisite con sistema da 1,5 T (ponderato T1, spessore 1mm, orientamento sagittale) per ciascun soggetto sono state ottenute prima della valutazione TMS-EEG.

All'inizio di ogni sessione sperimentale, dopo il montaggio EEG con cuffia precablata e il controllo delle impedenze, si è provveduto alla co-registrazione della posizione degli elettrodi sullo scalpo con sistema di neuronavigazione accoppiando le scansioni di RM per ottenere una ricostruzione 3D dello scalpo (distanza accettata <5mm) è stata quindi eseguita una registrazione EEG a riposo per cinque minuti, chiedendo ai soggetti di rilassarsi e di mantenere gli occhi chiusi. Il segnale EEG è stato continuamente monitorato durante le registrazioni per ridurre al minimo gli artefatti da movimento e verificare l'integrità degli elettrodi.

Durante la stimolazione TMS, i soggetti erano comodamente seduti su una sedia regolabile elettronicamente progettata per TMS (Nexstim, Helsinki, Finlandia) con gli avambracci appoggiati sugli appositi braccioli. Per garantire la veglia durante la sessione di registrazione ai partecipanti è stato chiesto di tenere gli occhi aperti e di fissare un bersaglio posto su un paravento ad una distanza di circa 70cm. Il click associato alla scarica del *coil* può evocare un complesso uditivo N100-P200 a latenza variabile tra 100 e 200ms. Per mascherare tale fenomeno, un rumore bianco è stato continuamente somministrato al soggetto attraverso degli auricolari. Il volume di mascheramento è stato progressivamente aumentato fino a quando il soggetto ha riferito che il clic TMS non era più udibile. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a stimolazione TMS dell'M1 di entrambi gli emisferi. Dopo l'identificazione dell'*hot spot* motorio e della RMT, 120 stimoli TMS ad un'intensità del 120% RMT sono stati dati separatamente per ogni emisfero in ordine randomizzato. I singoli stimoli TMS sono stati applicati con un intervallo *inter-pulse* variabile tra 1,5 e 1,8s che non influisce sui TEPs registrati longitudinalmente. La *timeline* sottostante riporta la sequenza di eventi del protocollo sperimentale:



2.6 Analisi statistiche descrittive dei dati

In considerazione della numerosità dei tre gruppi di pazienti inclusi nel presente progetto di tesi e della natura preliminare ed esplorativa della valutazione sperimentale, sono state applicate misure di statistica descrittiva (mediana e range interquartile) per la descrizione delle caratteristiche clinico-demografiche e neurofisiologiche e neurofisiologiche. Per lo stesso motivo, i risultati delle analisi dei dati neurofisiologici verranno riportati numericamente e visivamente per ogni paziente.

2.7 Analisi dei segnali

Le registrazioni EEG sono state esportate dal software di registrazione (NeurOne) in formato “eeg” e salvati in formato anonimizzato su un hardisk per le analisi offline.

L'analisi dei dati EEG offline è stata eseguita tramite EEGLAB v2023.0 con l'aggiunta di alcune funzioni incluse nel toolbox TMS-EEG Signal Analyser (TESA) (Rogasch et al., 2017) dei toolbox MATLAB (MathWorks Inc., Natick, USA). Al fine di ridurre i requisiti computazionali, la frequenza di campionamento dei dati è stata ridotta da 5000 Hz a 1000 Hz.

Al fine di rimuovere artefatti ricorrenti nel segnale, è stata successivamente applicata una *pipeline* basata sulla l'analisi delle componenti indipendenti (*Independent Component Analysis*, ICA) una delle tecniche più utilizzate di *Blind Source Separation* (BSS) (Rejer et al., 2013). L'analisi delle componenti indipendenti (ICA) è un algoritmo per trasformare un segnale in componenti distinte e non correlate. Quando l'ICA viene applicata ai dati EEG, ci si aspetta che alcune componenti assomiglino strettamente alle sorgenti originali dei segnali, mentre altre rappresenteranno probabilmente artefatti indesiderati (Rogasch et al., 2017).

Secondo questo metodo, le registrazioni EEG sono state inizialmente esaminate manualmente per identificare e rimuovere eventuali segnali artefattuali, un passaggio cruciale che migliora significativamente la qualità della ICA, soprattutto in caso di artefatti occasionali e non ricorrenti, come lo stringere intensamente la mascella o i movimenti del capo. Successivamente è stata applicata una ICA, che ha permesso di identificare, classificare e ordinare le componenti in base alla percentuale di varianza del segnale spiegata da ciascuna componente identificata. Le componenti sono state quindi visualizzate e classificate manualmente come artefatti o segnali fisiologici, ottenendo un nuovo set di dati.

Dopo la prima applicazione della ICA, volta alla rimozione degli artefatti di grande ampiezza (ad esempio muscolari), di decadimento e di movimento legati alla TMS, pone le basi per il successivo filtraggio passa-banda, migliorando ulteriormente i risultati della seconda applicazione della ICA, che ha lo scopo di eliminare gli artefatti rimanenti.

Infine, è stato eseguito il *rereferencing* dei dati applicando una referenza media (*common reference*).

Per ciascun soggetto è stata quindi determinato il *Global Mean Field Power* (GMFP), che si ottiene calcolando la deviazione standard dell'ampiezza del segnale su tutti gli elettrodi nel tempo. (Kallioniemi et al., 2022 J). La GMFP consente di valutare l'attività neurale complessiva dell'intera corteccia in risposta allo stimolo TMS, che può essere inoltre localizzata spazialmente tramite la valutazione topografica dell'origine dei segnali.

3.0 RISULTATI

3.1 Caratteristiche clinico-demografiche dei soggetti

I risultati delle analisi descrittive dei tre gruppi di soggetti inclusi nello studio (MP-MCI, aMCI e HC) sono riportati nella tabella II. I valori mediani dei punteggi della scala MoCA (corretti per scolarità) sono risultati pari a 21/30, al di sotto del *cut-off* per la definizione di deterioramento cognitivo (≤ 24 punti), indicando pertanto la presenza di un'alterazione globale delle funzioni cognitive in questi pazienti. In accordo con i criteri diagnostici dell'MCI (Portet et al., 2005) non sono state riscontrate alterazione nel punteggio ADL, indicando l'assenza di limitazioni nelle comuni attività della vita quotidiana. La riduzione nel punteggio delle IADL nel gruppo dei pazienti MP-MCI (valore mediano: 5/8) risulta probabilmente dall'impatto dei sintomi motori su attività più complesse.

Nei soggetti di controllo, il valore mediano del punteggio MoCA corretto è pari a 26/30, indicando quindi l'assenza di alterazioni cognitive significative in questo gruppo di soggetti.

Tabella II. Caratteristiche demografiche e neuropsicologiche. I valori riportati corrispondono alla mediana delle variabili considerate in ciascun gruppo di soggetti.

	MP-MCI	aMCI	HC
<i>Età' (anni)</i>	76	72	76
<i>MOCA</i>	21	21	26
<i>ADL</i>	6	6	6
<i>IADL</i>	5	8	8
<i>Scolarità (anni)</i>	11	13	14

3.2 Analisi dei TEPs

Al fine di valutare l'effetto della stimolazione TMS della M1 sull'attività corticale globale, le successive analisi si sono focalizzate sulla valutazione delle caratteristiche del GMFP.

In ciascun soggetto è stata quindi valutata la presenza e l'ampiezza dei picchi di attività del GMFP in corrispondenza di specifici intervalli di latenze rispetto allo stimolo TMS (che corrisponde al tempo zero) che corrispondono alle risposte EEG fisiologiche alla TMS: P30, P45, P60, N100 e P180. In particolare, i picchi positivi sono stati valutati negli intervalli di 20 – 37 ms, 48 – 75 ms e infine 150 -230. È stata inoltre valutata l'ampiezza dei picchi a polarità negativa tra i 38 – 48 ms e

tra 85 – 140 ms. L'ampiezza e la latenza dei picchi identificati con la suddetta metodologia sono riportati nella tabella III.

Tabella III. Caratteristiche dei picchi di attività identificati con l'analisi dei GMFP dei soggetti. I valori di ampiezza (Amp) sono espressi in μV_2 , mentre la latenza (Lat) rispetto allo stimolo TMS è espressa in millisecondi (ms).

Paziente	P30		N45		P60		N 100		P180	
	Lat	Amp	Lat	Amp	Lat	Amp	Lat	Amp	Lat	Amp
aMCI										
1	34	3.67	-	-	68	1.97	111	3.12	197	1.27
2	38	9.7	-	-	-	-	95	7.92	-	-
3	37	8.69	-	-	-	-	100	5.89	178	2.68
MP-MCI										
4	-	-	-	-	65	4.92	137	4.43	217	1.81
5	-	-	48	3.05	73	6.72	119	6.77	192	5.5
6	33	4.1	-	-	60	3.05	117	3.52	169	2.93
HC										
7	27	3.14	45	2.6	57	1.78	118	4.44	204	2.12
8	30	3.81	47	3.25	63	2.42	118	5.69	221	4.11
9	28	3.7	48	4.8	55	2.13	113	7.12	187	4.64
10	31	3.12	-	-	68	5.02	96	7.21	201	4.86

Successivamente è stato calcolato il valore della mediana dell'ampiezza dei picchi identificati in ciascun intervallo di frequenza (tabella IV).

Tabella IV. Valori mediani dell'ampiezza dei picchi di attività identificati con l'analisi dei GMFP in ciascun gruppo di soggetti.

Gruppo	P30	N45	P60	N 100	P180
HC	3.42	3.485	2.275	6.405	4.375
MP-MCI	-	-	4.92	4.43	2.93
aMCI	8.69	-	-	5.89	1.975

3.3 TEPs soggetti MP-MCI

Nelle seguenti immagini sono rappresentati i TEPs analizzati dei tre soggetti MP-MCI. (figura 7).

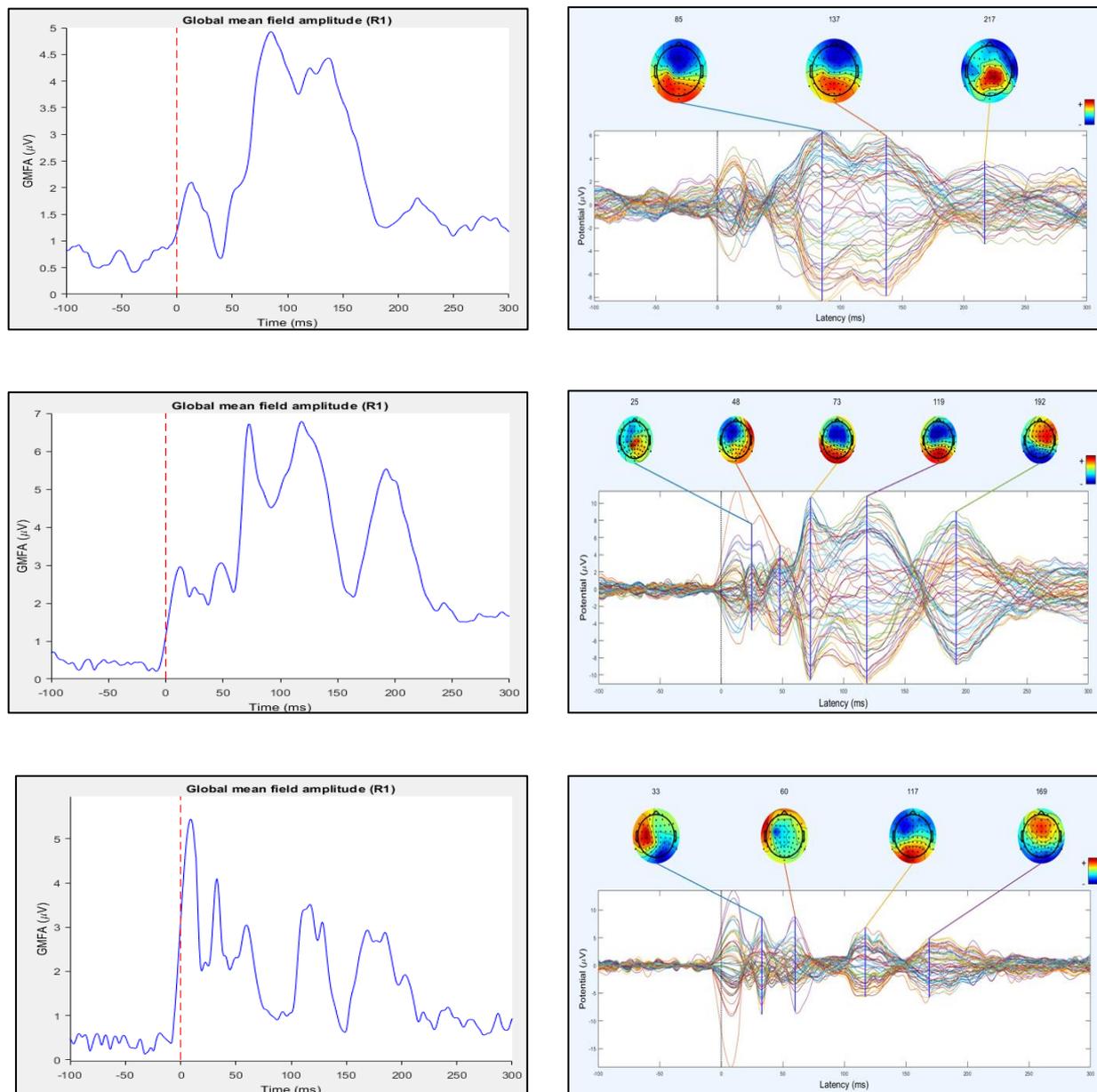


Figura 7. A sinistra GMFP, a destra Butterfly plot e mappa topografica dei TEPs, soggetti MP-MCI.

3.4 TEPs soggetti aMCI

Nelle seguenti immagini i TEPs analizzati dei soggetti aMCI. (figura 8).

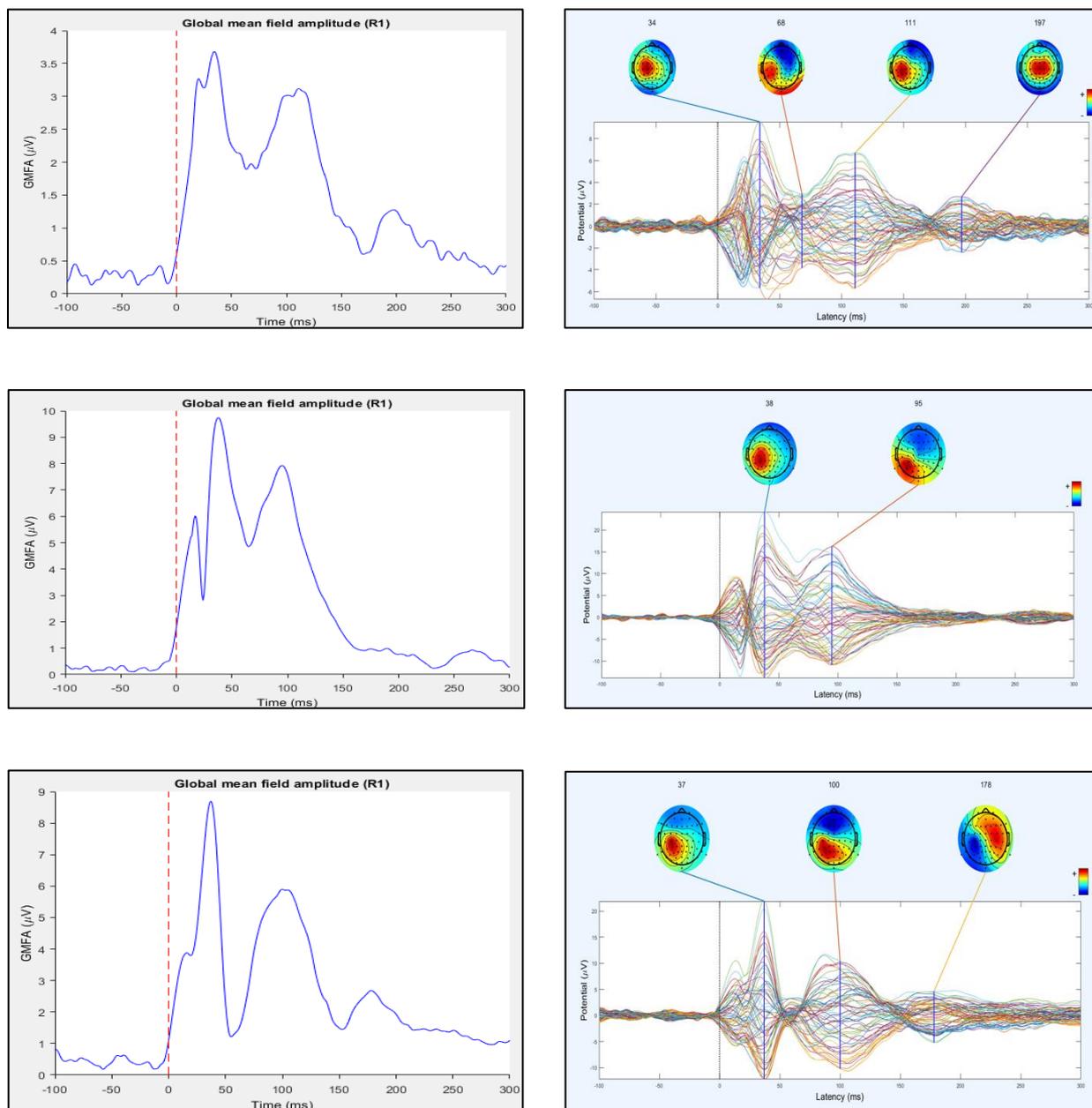


Figura 8. A sinistra GMFP, a destra Butterfly plot e mappa topografica dei TEPs, soggetti aMCI.

3.5 TEPs soggetti HC

Nelle immagini seguenti sono rappresentati i TEPs analizzati dei soggetti HC. (figura 9)

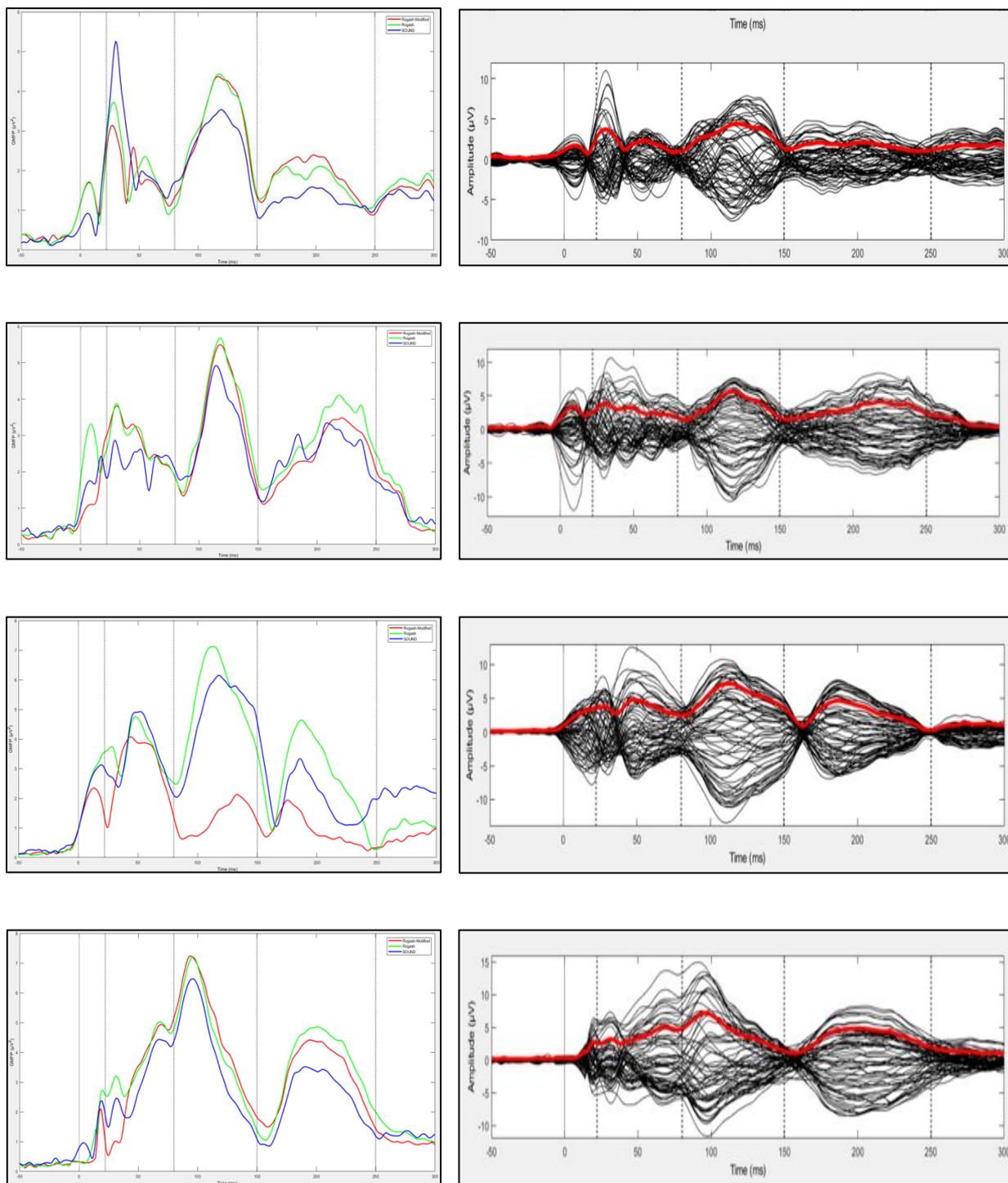


Figura 9. A sinistra rappresentazione dei TEPs, a destra Butterfly plot.

4.0 DISCUSSIONE

La stimolazione TMS combinata con la registrazione EEG può essere utilizzata nello studio non invasivo nella valutazione dell'eccitabilità corticale e nella connettività funzionale cerebrale seguendo la diffusione dell'attività elettrica dopo stimoli applicati localmente.

Nel presente studio di tesi abbiamo valutato le caratteristiche dei TEPs ottenuti tramite stimolazione della M1 dell'emisfero dominante in soggetti affetti da aMCI, MP-MCI e in soggetti sani di controllo (HC). I risultati delle valutazioni cliniche mostrano come, in accordo con i criteri di reclutamento, i pazienti con MCI mostrino valori di MoCA inferiori ai valori normali, tali da consentire la definizione di un deterioramento cognitivo. L'assenza di una limitazione nelle attività della vita quotidiana in questi soggetti corrisponde invece alla definizione di MCI secondo i più recenti criteri diagnostici. La definizione dei domini cognitivi maggiormente affetti è stata eseguita tramite valutazione neuropsicologica di secondo livello, tramite una batteria di test standardizzati.

I dati neurofisiologici presentati nel presente lavoro di tesi rappresentano dei risultati preliminari di uno studio attualmente in corso e la cui numerosità campionaria verrà ulteriormente ampliata.

In particolare, tramite l'analisi morfologica dei GMFP i risultati dimostrano la presenza di differenze nella presenza e nell'ampiezza tra i tre gruppi di soggetti studiati (tabella III e IV).

Nei soggetti affetti da aMCI i risultati mostrano un aumento dell'ampiezza della P30 rispetto ai HC. Questo dato è in accordo con i risultati di un precedente studio condotto in soggetti con AD e aMCI (Julkunen et al., 2008). In particolare, mentre i pazienti con AD presentavano una riduzione dell'ampiezza della P30 rispetto a soggetti sani di controllo, i pazienti affetti da MCI presentavano un'attività aumentata a livello della P30. In uno studio successivo dello stesso gruppo, l'ampiezza della P30 ha dimostrato una buona sensibilità e specificità nell'identificare soggetti sani di controllo rispetto a pazienti con MCI e AD, mostrando inoltre una correlazione diretta con i punteggi clinici alle scale di valutazione cognitive. Al contrario, nei pazienti con MP-MCI questa componente non è stata identificata in due soggetti su tre. In un recente studio sperimentale condotto su pazienti con MP i TEP da stimolazione di M1 e pre-SMA (*Supplementary Motor Area*, SMA) sono stati valutati in 20 pazienti affetti MP (prima e dopo l'assunzione di levodopa) e 19 controlli sani (HC). Sono stati inoltre valutate le possibili correlazioni con i sintomi motori dei pazienti (bradicinesia degli arti). I pazienti con MP non trattati, rispetto agli HC, avevano risposte P30 più piccole dal lato M1 controlaterale (M1+) e omolaterale (M1-) al lato del corpo più sintomatico e un aumento di ampiezza N40 pre-SMA. La terapia dopaminergica ha normalizzato l'ampiezza di M1+ e M1-P30 così come N40 pre-SMA. È stata inoltre descritta una correlazione positiva tra l'ampiezza M1+P30 e la bradicinesia nei pazienti con MP prima dell'assunzione della terapia dopaminergica. Inoltre, le alterazioni della P30 dopo stimolazione della M1 e N40 da stimolazione della pre-SMA nel MP

suggeriscono che l'eccitabilità di M1 è ridotta su entrambi i lati, mentre l'eccitabilità pre-SMA è aumentata. L'effetto della terapia dopaminergica e la correlazione clinica suggeriscono che questi cambiamenti corticali possono riflettere un'attività anomala dei circuiti cortico-basali (Leodori et al., 2020). Sebbene i soggetti inclusi nello studio diLeodori et al. non presentassero MCI, la concordanza con i risultati del presente studio sembra indicare la persistenza di alterazioni della P30 tipiche della MP nonostante lo sviluppo di MCI in questi pazienti. Al contrario, la componente N45 non è stata rilevata in alcun soggetto affetto da aMCI ed in un solo soggetto affetto da MP-MCI, mentre è stata riscontrata in tutti gli HC (figura 9, tabella III e IV). Questo risultato è in accordo con un recente studio condotto su soggetti con aMCI e soggetti sani di controllo (Ferreri et al., 2021) in cui è stato descritto una riduzione della GMFA nell'intervallo 45-50 ms dopo lo stimolo DBS. Nello studio di Julkunen et al., inoltre, le componenti N45 e P60 sono risultate meno frequenti nei pazienti con MCI rispetto a soggetti sani di controllo. In accordo con tale osservazione, la valutazione descrittiva dei risultati del presente studio, ha evidenziato come la P60 sia presente in un solo paziente con aMCI su tre, mentre è stata riscontrata in tutti i soggetti con MCI-PD e HC. Inoltre, nello stesso studio è stata riscontrata una diminuzione dell'ampiezza della N100 nei pazienti con MCI rispetto ai controlli sani (Julkunen et al, 2008). I nostri risultati mostrano i pazienti MP-MCI presenti i valori di ampiezza N100 più bassi rispetto ai soggetti con aMCI e HC. Tuttavia, considerata la variabilità dell'ampiezza della N100 riscontrata nei pazienti con aMCI (figura 10) tale dato dovrà essere riconfermato dopo l'aumento della numerosità campionaria.

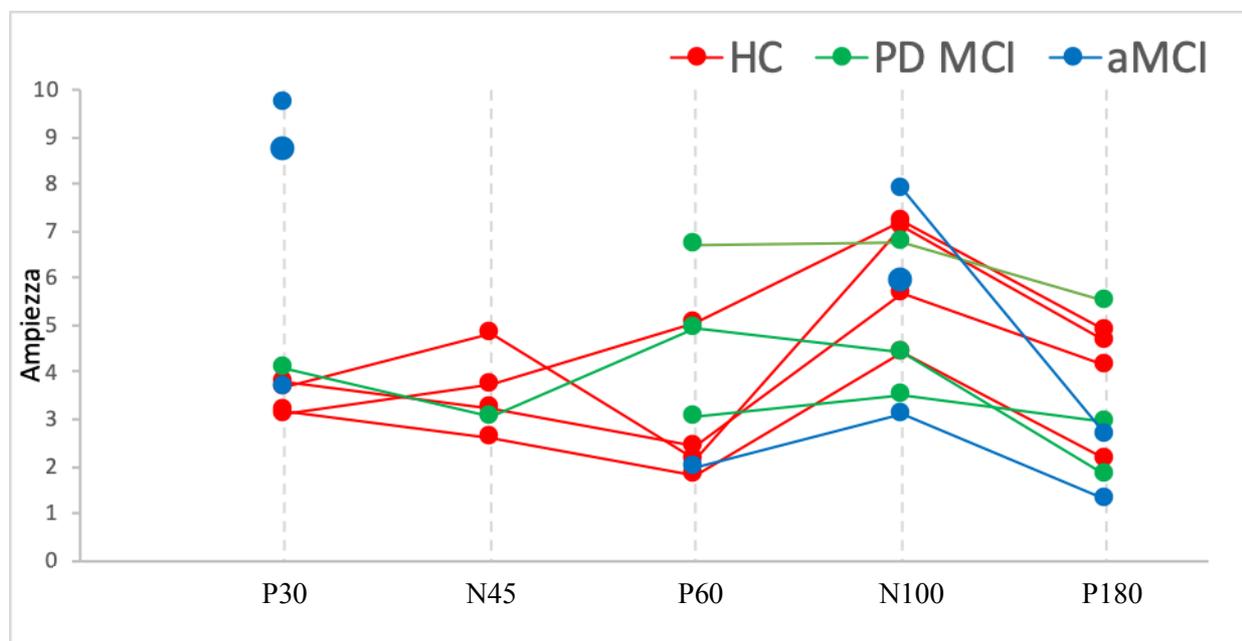


Figura 10. Rappresentazione dei valori di ampiezza del GMFP nei pazienti MP-MCI (in verde), nei pazienti aMCI (in blu) e nei HC (in rosso) a livello di specifiche latenze dallo stimolo TMS (P30, N45, P60, N100, P180).

La ricerca degli articoli scientifici è avvenuta sulla banca dati PubMed. La letteratura fornisce ancora poco materiale dimostrando l'esigenza di nuovi studi. Una sintesi degli studi con il nome dell'autore, il titolo, l'anno di pubblicazione nella banca dati è riassunta nella tabella VI.

Tabella VI. Studi pubblicati nella banca dati PubMed. Autore, titolo e anno di pubblicazione.

Autore	Titolo	Anno di Pubblicazione
P. Julkunen et al.	<i>Navigated TMS combined with EEG in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a pilot study</i>	2008
J. Zhang et al.	<i>Classification of Cognitive Impairment and Healthy Controls Based on Transcranial Magnetic Stimulation Evoked Potentials</i>	2021
E. Formaggio et al.	<i>Oscillatory EEG-TMS Reactivity in Parkinson Disease</i>	2021
F. Ferreri et al.	<i>Sensorimotor cortex excitability and connectivity in Alzheimer's disease: A TMS-EEG Co-registration study</i>	2016
G. Leodori et al.	<i>Motor Cortical Network Excitability in Parkinson's Disease</i>	2022

Uno studio pubblicato nel 2021 valutava 43 soggetti di cui 21 con deterioramento cognitivo e 22 controlli sani. Tutti sono stati sottoposti ad uno stimolo TMS-EEG a impulso singolo, in cui gli impulsi sono stati dati alla corteccia prefrontale dorsolaterale di sinistra. In questo caso i ricercatori si sono concentrati sullo studio delle componenti N100 e P200. Le caratteristiche dell'N100 hanno ottenuto le migliori prestazioni nel classificatore Support Vector Machine (SVM) con una precisione dell'88,37%. Sotto l'aspetto della spazialità, le caratteristiche della regione frontale destra e della regione parietale sinistra hanno avuto le migliori prestazioni nel classificatore SVM. Latenza e ampiezza hanno contribuito maggiormente alla classificazione per la diagnosi di CI. Nel gruppo con il deterioramento cognitivo il cambiamento di N100 e P200 poteva essere correlato alle alterazioni dell'attività GABAergica cerebrale rispetto ai controlli sani.

Le conclusioni della tesi dimostrano che i TEP indotti dalla TMS sulla DLPFC sinistra presentano differenze significative nello spazio e nel tempo tra CI e HC. L'apprendimento automatico basato sulle caratteristiche spaziotemporali dei TEP ha la capacità di separare CI e HC, il che suggerisce come dimostrato nel nostro studio, i TEP hanno un potenziale come biomarcatori non invasivi per la diagnosi di IC (Zhang et al., 2021).

Un diverso studio TMS-EEG ha incluso dodici pazienti con AD che sono stati reclutati poco dopo la prima diagnosi di demenza e dodici volontari sani. Tutti sono stati sottoposti a delle sedute di

TMS-EEG. Dall'esito dei dati si osserva che l'analisi delle mappe ha evidenziato un netto aumento dell'eccitabilità corticale nei pazienti con AD in particolare nel periodo 24-90ms dopo lo stimolo.

In alcuni pazienti, nove su dodici, si è osservata una componente aggiuntiva a 80ms dopo lo stimolo.

L'analisi della latenza dei picchi ha mostrato una differenza significativa nell' N100: nei controlli era più precoce rispetto ai pazienti con AD.

Questi cambiamenti potrebbero essere interpretati come un meccanismo compensatorio che consente la conservazione della programmazione e dell'esecuzione sensomotoria per un lungo periodo di tempo, indipendentemente dalla progressione della malattia (Ferreri et al., 2016).

5.0 CONCLUSIONI

Tramite l'analisi dei TEPs ottenuti tramite stimolazione TMS della M1 in pazienti con MP-MCI, aMCI e HC, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo quello di valutare se sia possibile il loro utilizzo come biomarcatori di MCI

I risultati del presente studio mostrano come sia possibile identificare delle caratteristiche distintive della risposta corticale allo stimolo TMS sulla base dell'analisi dell'ampiezza dei picchi di attività dei TEPs registrati su tutti i canali EEG. Questo potrebbe fornire un'ulteriore evidenza sulle differenze nei processi fisiopatologici responsabili dello sviluppo di deterioramento cognitivo in pazienti con MP e soggetti con evidenza di degenerazione corticale (es. con preponderanti disturbi della memoria o della prassia).

Questi risultati rafforzano dunque l'ipotesi che i TEPs possano rappresentare dei biomarcatori di malattia anche nelle diverse forme di MCI.

Nel corso dell'esecuzione del protocollo si sono riscontrate alcune difficoltà soprattutto correlate alla strategia di scelta dei pazienti e la possibilità di disporre immagini in RM di qualità sufficiente affinché la macchina fosse in grado di ricostruire il modello 3D per la neuronavigazione.

5.1 Proposte per il futuro

Lo studio pilota condotto per la presente tesi ha analizzato un piccolo campione di pazienti rendendo necessario ampliare a popolazioni più estese per poter avere dati più specifici. Inoltre ulteriori studi saranno necessari per estendere tali evidenze a pazienti con diverse forme di demenza, identificando quindi i potenziali marcatori di rischio di progressione a specifiche demenze.

Un approccio interessante per il futuro potrebbe essere quello di sviluppare protocolli più veloci di esecuzione e piattaforme di programmazione più rapide nell'analisi dei dati, tali da avere nell'immediato un riscontro e fornire al paziente dettagli sempre più precisi rispetto alla sua condizione di salute.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Aarsland D., Batzu L., Halliday G.M., Geurtsen G.J., Ballard C., Chaudhuri K.R., 2021. Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nature Review Disease Primers*; 7(1):47.
- [2] Angelini C., Battistin L., 2022. *Neurologia Clinica. Esculapio*, pp. 62-63.
- [3] Armstrong M.J., Okun M.S., 2020. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*, 323 (6): 548-560. doi: 10.1001/jama.2019.22360.
- [4] Beniczky S., Schomer D.L., 2020. Electroencephalography: basic biophysical and technological aspects important for clinical applications. *22 (6):697-715*.
- [5] Bertora P., 2015. *Neurologia per I corsi di Laurea in Professioni Sanitarie. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova*. pp. 1-5.
- [6] Campbell N.L., Unverzagt F., LaMantia M.A., Khan B.A., Boustani M.A., 2018. Risk factors for the progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia. *Clinic Geriatric Medicine*: 29(4): 873-893.
- [7] Casarotto S., Turco F., Comanducci A., Pezzoli G., Rosanova M., Isaias I.U., 2018. Excitability of the supplementary motor area in Parkinson's disease depends on subcortical damage. *Vol 12, pp:152-160*.
- [8] Farina N., Isaac M.G., Clark A.R., Rusted J., Tabet N., 2012. Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*. 4(4):CD002854.
- [9] Farzan F., Bortoletto M., 2022. Identification and verification of a "true" TMS evoked potential in TMS-EEG, *Journal of Neuroscience Methods*, Volume 378, 109651.

- [10] Ferreri F., Rossini PM., 2013. TMS and TMS-EEG techniques in the study of the excitability, connectivity, and plasticity of the human motor cortex. *Review Neuroscience*; 24(4):431-42.
- [11] Ferreri F., Vecchio F., Vollero L., Guerra A., Petrichella S., Ponzo D., et al., 2016. Sensorymotor cortex excitability and connectivity in Alzheimer's disease: A TMS-EEG Co-registration study. *Hum Brain Map* 2016; 37(6):2083-96.
- [12] Ferreri F., Guerra A., Vollero L., Ponzo D., Pasqualetti P., Vecchio F., et al., 2021. TMS-EEG Biomarkers of Amnesic Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease: A Proof-of-Concept Six Years Prospective Study. Volume 13 – 2021. *Sec. Alzheimer's Disease and Related Dementias*; 13:737281.
- [13] Fiore F., 2017. *Il Sistema motorio e la corteccia motoria - introduzione alla psicologia. State of Mind.*
- [14] Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., 1975. "Mini-Mental state": A Practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, *Journal of Psychiatric Research*, Volume 12, pp: 189-198.
- [15] Formaggio E., Tonellato M., Antonini A., Castiglia L., Gallo L., Manganotti P., 2021. Oscillatory EEG-TMS Reactivity in Parkinson's Disease. *J Clinic Neurophysiology*; 40(3):263-268.
- [16] Gauthier S., Reisberg B., Zaudig M., Petersen R.C., Ritchie K., Broich K., et al., Mild Cognitive Impairment. *The Lancet*. 15 Aprile 2006; 367(9518):1262-70.
- [17] Hernandez-Pavon J.C., Veniero D., Bergmann T.O., Belardinelli P., Bortoletto M., Casarotto S., et al., 2023. TMS combined with EEG: Recommendations and open issues for data collection and analysis. *Chicago USA*; 16(2):567-593.

- [18] Julkunen P., Jauhiainen A.M., Westeren-Punnonen S., Pirinen E., Soininen H., Kononen M., et al. 2008. Navigated TMS combined with EEG in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a pilot study. *Clinical Trial. Neuroscience Methods*; 172(2):270-6.
- [19] Jongsiriyanyong S., Limpawattana P., 2018. Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article. *Sage Journal*; 33(8):500-507. doi:10.1177/1533317518791401.
- [20] Kallioniemi E., Saari J., Ferreri F., Määttä S., 2022. TMS-EEG responses across the lifespan: Measurement, methods for characterization and identified response. *Journal of Neuroscience Methods*. Jan; 366:109430.
- [21] Kehagia A., Barker R.A., Robbins T.W., 2010. Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurology*; 9(12):1200-1213.
- [22] Kenneth S. Saladin, 2011. *Anatomia & Fisiologia*. 5° edizione, Piccin, pp. 468-469.
- [23] Komssi S., Kahkonen S., 2006. The novelty value of the combined use of electroencephalography and transcranial magnetic stimulation for neuroscience research. *Brain Research Reviews*. Volume 2 Pages: 183-192.
- [24] Langa K.M., Levine D.A., 2014. The Diagnosis and Management of Mild Cognitive Impairment: A Clinical Review. *JAMA*. doi: 10.1001/jama.2014.13806.
- [25] Leodori G., De Bortolo M.I., Guerra A., Fabbrini A., Rocchi L., La Torre A., et al., 2020. Motor Cortical Network Excitability in Parkinson's Disease. *Movements Disorder*; 37(4):734-744.
- [26] Mecarelli O., 2021. *Manuale teorico Pratico di elettroencefalografia*. Springer Healthcare Italia Srl, pp. 8-9.

- [27] Peteresen R.C., 2016. Mild Cognitive Impairment, Continuum, American Academy of neurology, Vol. 22 (2 Dementia), 404-418.
- [28] Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkman J., 2017, Parkinson disease. Nature reviews disease primers. 23:3:17013.
- [29] Portet F., Ousset P.J., Visser P.J., Frisoni G.B., Nobili F., Scheltens PH., 2005. Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: a critical review of the concept and new diagnostic procedure. Report of the MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease. BMJ Journals Volume 77, Issue 6.
- [30] Rogasch NC., Sullivan C., Thomson R.H., Rose N.S., Bailey N.W., Fitzgerald P.B., et al. 2017. Analysing concurrent transcranial magnetic stimulation and electroencephalographic data: A review and introduction to the open-source TESA software. NeuroImage; 147:934-51.
- [31] Rejer I and Górski P., 2013. Independent Component Analysis for EEG Data PreProcessing – Algorithms Comparison, in *Computer Information Systems and Industrial Management*, vol. 184, K.Saeed, Chaki R., Cortesi A., and S. Wierzchon Eds., in Lecture Notes in Computer Science, vol 8104. Berlin, Heidelberg: 2013, pp108-119.
- [32] Sanford M.A., 2017. Mild Cognitive Impairment, Clinic geriatrics medicine; 33(3): 325-337. doi: 10.1016/j.cger.2017.02.005.
- [33] Seneviratne U., 2023. Making Sense of the EEG: From Basic Principles to Clinical Applications. First edition 2023. CRC Press 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton. pp: 3-4.
- [34] Tremblay S., Rogasch N.C., Premoli I., Blumberger D.M., Casarotto S., Chen R., et al., 2019. Clinical utility and prospective of TMS-EEG. Clinic Neurophysiology; 130(5):802-844. doi: 10.1016/j.clinph.2019.01.001.

[35] Winblad B., Gauthier S., Scinto L., Feldman H., Wilcock G.K., Truyen L., et al. 2008. Safety and efficacy of galantamine in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 70 (22): 2024-35.

[36] Xiuxiu H., Xiaoyan Z., Bei L., Ying C., Shifang Z., Qiaoqin W., et al. 2022. Comparative efficacy of various exercise interventions on cognitive function in patient with mild cognitive impairment or dementia: A systematic review and network meta-analysis. *Sport Health Sci.*, 11(2):212-223.

[37] Zhang J., Lu H., Zhu L., Ren H., Dang G., Su X., et al., 2021. Classification of Cognitive Impairment and Healthy Controls Based on Transcranial Magnetic Stimulation Evoked Potentials. *Front Aging Neuroscience*; 13:804384.