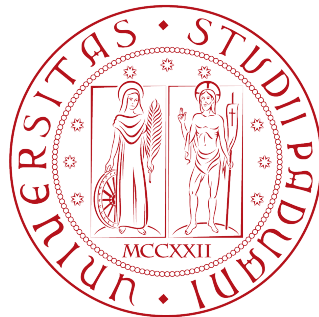


Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Statistiche

Corso di Laurea Triennale in
Statistica per le Tecnologie e le Scienze



RELAZIONE FINALE

Analisi degli effetti della stimolazione
transcranica a corrente alternata nel
trattamento del dolore cronico

Relatrice Prof.ssa Manuela Cattelan
Dipartimento di Scienze Statistiche

Laureando: Francesca Stecca
Matricola: 1150292

Anno Accademico 2018/2019

Indice

Introduzione	1
1 Il dolore cronico	3
1.1 Il dolore	3
1.1.1 Trattamento del dolore cronico	4
1.2 Onde cerebrali	5
1.2.1 Tipologie di onde cerebrali	5
1.2.2 Oscillazioni e patologie	6
1.3 Stimolazione transcranica non invasiva	6
1.4 Caso di studio	6
1.4.1 Disegno dello studio e partecipanti	6
1.5 Dataset	8
1.5.1 Dati EEG	8
1.5.2 Dati questionari e test	10
1.5.3 Obiettivo dello studio	11
2 Analisi descrittive	13
2.1 Onde cerebrali	13
2.2 Risultati di questionari e test	17
3 Inferenza	21
3.1 Test con segno di Wilcoxon per dati appaiati	21
3.1.1 Calcolo del test	22
3.1.2 Esempio del test di Wilcoxon	22
3.1.3 Applicazione al caso di studio	25
3.2 Modello lineare normale ad effetti misti	30
3.2.1 Modello lineare con intercetta casuale	31

3.2.2	Applicazione al caso di studio	32
3.3	Risultati delle analisi	39
	Conclusioni	41
	Bibliografia	43

Introduzione

Nel corso degli anni, dopo la scoperta da parte di Hans Berger nel 1929 dell'elettroencefalografia, l'interesse degli studiosi si è rivolto a capire come alcune patologie (ad esempio le malattie di Parkinson e di Alzheimer) fossero collegate ad anomalie nell'attività elettrica presente nel sistema nervoso centrale e a come curarle. La stimolazione transcranica è una procedura non invasiva che permette di trascinare le frequenze delle oscillazioni cerebrali verso la frequenza erogata dallo strumento e cambiare i ritmi cerebrali sottostanti. In questa tesi si vuole verificare se l'utilizzo della stimolazione transcranica a corrente alternata sia in grado di alleviare il dolore provato in pazienti affetti da dolore cronico. Nel Capitolo 1 vengono introdotti argomenti di ambito medico in modo da comprendere al meglio il caso di studio analizzato. L'analisi si concentra sull'andamento delle onde cerebrali dei soggetti tenendo conto di questionari neuropsicologici e test cognitivi. I dati raccolti non sono indipendenti tra loro in quanto per ogni soggetto vengono effettuate diverse rilevazioni nel corso della durata dello studio. I risultati delle analisi esplorative vengono raccolti nel Capitolo 2; i valori inerenti alla terapia sotto ipotesi vengono visualizzati in diversi grafici, in modo da capire l'andamento generale dello stato di salute dei soggetti. Il Capitolo 3 introduce la teoria statistica del test con segno di Wilcoxon per dati appaiati che è adatto ad analizzare dati rilevati più volte sullo stesso soggetto. Viene utilizzato anche il modello lineare normale ad effetti misti per capire quali siano i fattori che condizionano di più le onde cerebrali, tenendo comunque conto della struttura di dipendenza sottostante ai dati. Sempre nel Capitolo 3 vengono riportati tutti i risultati ottenuti utilizzando il software RStudio (R Core Team, 2018) e i relativi comandi. Vengono infine riportate le conclusioni e alcune proposte per migliorare futuri studi.

Capitolo 1

Il dolore cronico

Questa tesi si occupa di analizzare l'effetto della stimolazione transcranica alternata applicata a pazienti che soffrono di dolore cronico. Dopo una breve introduzione di natura medica sul dolore, sulle onde cerebrali e sulla stimolazione transcranica verranno descritti i dataset utilizzati.

1.1 Il dolore

L'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore (IASP), ha definito il dolore come “un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno ” (Merskey, 1991). Si tratta di un'esperienza individuale e soggettiva, principalmente caratterizzata da componenti puramente sensoriali, relative al trasferimento dello stimolo doloroso dalla periferia alle strutture centrali, e da componenti esperienziali e affettive, che possono variare significativamente la percezione del dolore (Merskey, 1991). Sulla base di caratteristiche cliniche, di durata e di responsività terapeutica, il dolore può essere suddiviso in acuto, cronico e procedurale. Elemento principale di questa tesi è il dolore cronico: esso è duraturo nel tempo ed è determinato dal persistere dello stimolo dannoso e da fenomeni di automantenimento dove la sensazione dolorosa persiste anche quando la causa iniziale si è limitata. Il dolore condiziona negativamente le prestazioni fisiche e gli aspetti sociali del paziente e deriva principalmente da malattie ad andamento cronico, come quelle reumatiche, ossee e oncologiche. Nonostante tale definizione, non esiste nella pratica clinica un parere uniforme sulla distinzione tra dolore acuto e cronico (De Zen, 2019).

Il dolore può anche essere classificato in base alla fisiopatologia, ossia secondo le modifiche presentate nelle funzioni organiche nel corso di una qualsiasi condizione patologica, in:

- nocicettivo (somatico o viscerale);
- non nocicettivo (neuropatico e psicogeno);
- misto.

Il dolore nocicettivo insorge dalla stimolazione dei nocicettori, ossia neuroni periferici sensoriali in grado di segnalare un danno tissutale mediante sensazioni dolorose (Dubin e Patapoutian, 2010). Questi neuroni periferici portano informazioni inerenti la localizzazione, la natura e l'intensità del dolore direttamente al talamo contro laterale e poi alla corteccia cerebrale, dove avviene la percezione cosciente del dolore. Per gestire tale percezione, si attiva una complessa rete di sistemi biochimici, fisiologici e psicologici, influenzata quindi anche della personalità dell'individuo.

Il dolore neuropatico è invece un “dolore causato da una lesione o malattia del sistema somato-sensoriale” (Merskey, 1991). Di norma quando si subisce un danno, il sistema nervoso centrale e periferico diventano ipersensibili al dolore in modo da agevolare la guarigione. Tuttavia possono insorgere anomalie del sistema nervoso centrale e periferico che provocano l'insorgenza del dolore neuropatico: stimoli in realtà non dolorosi vengono amplificati e percepiti dal soggetto come stimoli dolorosi.

1.1.1 Trattamento del dolore cronico

Nel corso degli anni si è cercato di comprendere al meglio tale patologia, tuttavia essendo un ambito della medicina molto vario e non ancora compreso nei dettagli, si sono verificati approcci terapeutici non sempre efficaci. Sono state così definite alcune linee guida da parte del ministero della sanità italiano (Fanelli et al., 2013): il farmaco da prescrivere al paziente deve essere scelto in base alla tipologia, all'intensità, alla durata, alla sede e ai fattori che scatenano il dolore. Viene prescritto il paracetamolo per dolore di intensità lieve per poi aggiungere oppiacei nel caso in cui il dolore fosse particolarmente intenso. Se la sensazione di dolore continua a persistere o addirittura a peggiorare, si passa a somministrare al paziente oppiacei ancora più forti come la morfina. Per quanto riguarda terapie non farmacologiche, si ritiene che l'esercizio fisico ed aerobico svolga un ruolo importante nel miglioramento del benessere globale e della sensazione di dolore del paziente, in particolare per pazienti malati di fibromialgia (Bidonde et al., 2017).

1.2 Onde cerebrali

L'attività elettrica ritmica o ripetitiva del sistema nervoso centrale di un individuo è definita delle onde cerebrali. Esse misurano solo pochi milionesimi di volt e la loro importanza nei processi cognitivi e nella neuropatologia è sempre più rilevante (Buzsáki e Draguhn, 2004). Le onde cerebrali vengono misurate mediante frequenze, calcolate in cicli al secondo (Hertz, Hz) e rappresentate con tracciati grafici detti elettroencefalogrammi. L'elettroencefalografia (EEG) permette quindi di registrare l'attività elettrica cerebrale riproducendola sotto forma di una serie di onde (Figura 1.1), mediante l'utilizzo di alcuni elettrodi posizionati sul cuoio capelluto (Berger, 1929).

1.2.1 Tipologie di onde cerebrali

Le onde cerebrali vengono solitamente divise in cinque bande che rispecchiano diverse attività del cervello. Le onde della banda delta (0,5-3 Hz) vengono associate al sonno più profondo, senza sogni, che induce al rilassamento psicofisico. Le onde theta (4-8 Hz) sembrano essere correlate a processi legati all'apprendimento e alla memoria e sono più frequenti mentre si sogna o si immagina ad occhi chiusi. Le onde alpha (8–13.9 Hz) sono associate ad uno stato di coscienza vigile ma in soggetti comunque rilassati, mentre le onde beta (14-30 Hz) si registrano durante le normali attività di veglia, con occhi aperti e focalizzazione esterna. Le bande gamma (30-90 Hz) si manifestano in uno stato di iper concentrazione (De Zen, 2019).

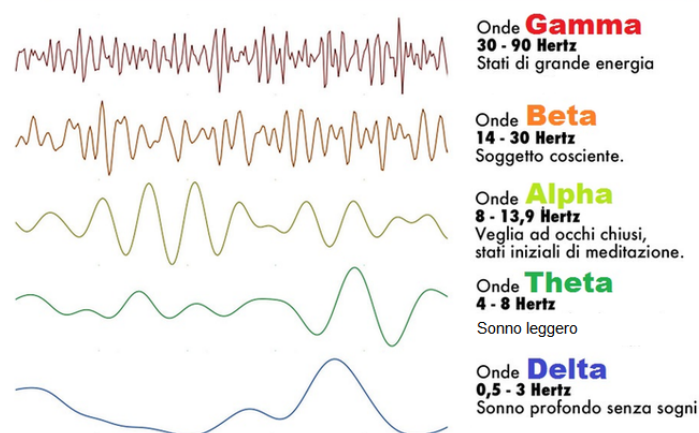


Figura 1.1: Campioni di onde cerebrali con frequenze dominanti appartenenti a bande beta, alfa, theta e delta e onde gamma.

1.2.2 Oscillazioni e patologie

Negli ultimi decenni la comunità scientifica si è concentrata sull'analisi di una possibile relazione tra le anomalie riscontrate nelle oscillazioni cerebrali e stati patologici, come per il dolore cronico, dove viene osservato un rallentamento delle frequenze (De Zen, 2019). I lavori di Sarnthein et al. (2005) e Santos Pinheiro et al. (2016) dimostrano come il dolore cronico sia legato ad onde cerebrali tendenzialmente spostate verso le frequenze appartenenti alla banda theta. Altri lavori invece (Kamei et al., 2010 e Han et al., 2013) si sono concentrati nello studio di pattern EEG di pazienti malati di Parkinson, dimostrando che già all'inizio della patologia si possono notare rallentamenti del ritmo delle oscillazioni cerebrali. In particolare si nota un aumento delle frequenze delle bande delta e theta a discapito delle bande alpha e beta.

1.3 Stimolazione transcranica non invasiva

La stimolazione elettrica transcranica è un metodo di stimolazione del cervello: un ricercatore posiziona dei piccoli dischi o spugne chiamati “elettrodi” sulla testa del paziente e questi inviano una debole corrente elettrica al cervello (Nitsche et al., 2008). In base alla modalità di erogazione della corrente, la stimolazione si divide in:

- stimolazione a corrente alternata (tACS);
- stimolazione a corrente continua (tDCS);
- stimolazione a rumore casuale (tRNS).

In questo studio si va a verificare l'efficacia della tACS, ossia una corrente di tipo sinusoidale e non monofasica (Thut, Schyns e Gross, 2011). L'obiettivo di tale tecnica è trascinare le frequenze di oscillazione cerebrali verso la frequenza erogata dallo strumento (De Zen, 2019). È da non sottovalutare il fatto che molti farmaci possono alterare la stimolazione transcranica a corrente continua modificando l'eccitabilità cellulare.

1.4 Caso di studio

1.4.1 Disegno dello studio e partecipanti

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Azienda Ospedaliera di Padova (protocollo n. 3507/AO/15) ed è registrato su [ClinicalTrials.Gov](https://clinicaltrials.gov).

Sono stati selezionati 15 pazienti maggiorenni con diagnosi di dolore cronico, con durata della

patologia superiore a 6 mesi, valore della scala visuo-analogica del dolore (VAS) maggiore di 3 e immuni all'effetto di almeno tre farmaci. La scala visuo-analogica del dolore (VAS) viene utilizzata per misurare le caratteristiche soggettive del dolore provato dal paziente: come si può notare dalla Figura 1.2 il valore 0 corrisponde a nessun dolore, il valore 5 corrisponde a dolore moderato fino a raggiungere il valore 10 di massimo dolore.

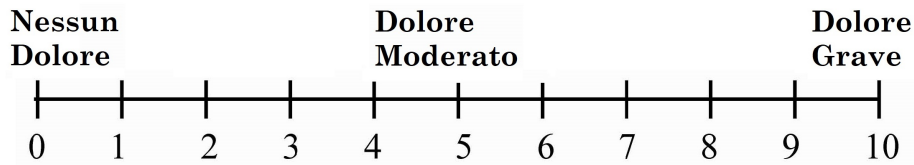


Figura 1.2: Scala visuo-analogica del dolore (VAS).

Nello specifico, tre pazienti soffrono di nevralgia del nervo pudendo e i restanti sono affetti dalla sindrome fibromialgica. Il disegno di studio è di tipo cross over: i pazienti vengono divisi all'inizio casualmente in due gruppi, in uno viene applicata la tACS nell'altro la tRNS. Alla fine dei trattamenti vi è un periodo di 8 settimane, detto wash out, dove i pazienti non vengono più stimolati in modo da annullare gli effetti delle terapie effettuate in precedenza e poter applicare nuovamente i trattamenti. I pazienti trattati inizialmente con tACS vengono poi trattati con tRNS e viceversa. I dati vengono rilevati in tre tempi diversi e consistono in:

- registrazione EEG;
- questionari neuropsicologici;
- questionari per la valutazione clinica;
- test neuropsicologici.

Nella Figura 1.3 viene descritto lo schema di svolgimento del primo braccio dello studio:

- al tempo T0 vengono rilevati i dati sopracitati per ogni paziente;
- i soggetti vengono poi divisi casualmente ed iniziano la terapia assegnata abbinata all'esercizio fisico. Più precisamente ogni paziente effettua 10 sedute, cinque a settimana, per due settimane consecutive. Ogni seduta è composta da stimolazione transcranica mediante tACS oppure tRNS, a seconda del gruppo di appartenenza del paziente, e da 60 minuti di riabilitazione fisica (De Zen, 2019);
- al tempo T1, subito dopo i trattamenti, vengono rilevati nuovamente i dati;

- al tempo T2, quattro settimane dopo il tempo T1, vengono registrati i dati sostanzialmente per capire se i pazienti beneficiano ancora dei trattamenti.

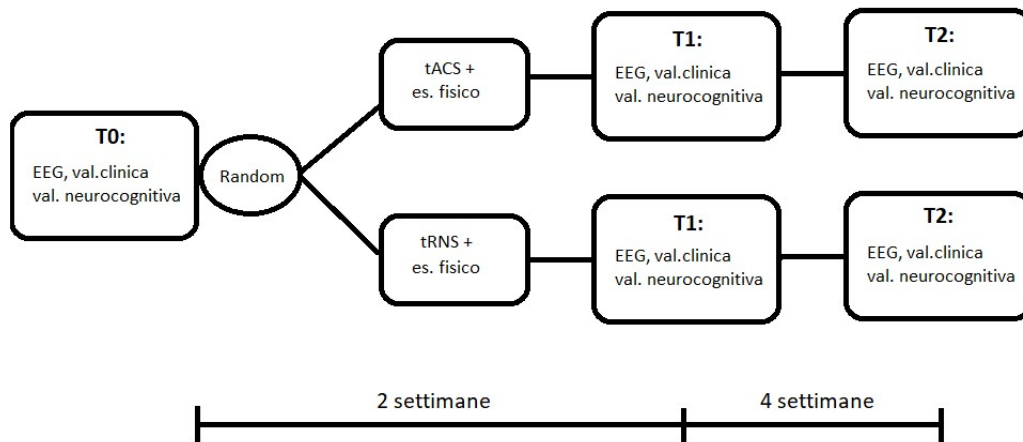


Figura 1.3: Schema di svolgimento di un braccio dello studio (De Zen, 2019).

Lo schema appena descritto si ripete dopo il periodo di wash out di 8 settimane invertendo ai soggetti il trattamento di stimolazione transcranica.

1.5 Dataset

I dati rilevati vengono raccolti in due dataset, il primo è inerente alle registrazioni EEG e il secondo include le risposte dei pazienti ai vari test e questionari somministrati. Entrambi vengono analizzati mediante il software RStudio (R Core Team 2018).

1.5.1 Dati EEG

Il dataset può essere visto sia in formato lungo che largo. Per capire al meglio le variabili in esame, è preferibile il formato lungo (Tabella 1.1), le cui dimensioni sono 2700 righe per 7 colonne.

Variabili osservate

La prima colonna riporta i valori EEG, successivamente seguono 5 variabili esplicative e l'ultima colonna indica il soggetto a cui appartengono tali rilevazioni, con valori da 1 a 15.

Variabili esplicative

Le variabili esplicative sono:

	valori	gruppo	tempo	area	parte	tipo	soggetto
1	26.54	sham	T0	frontale	destra	delta	1
2	15.73	sham	T0	frontale	destra	delta	2
...
2699	27.86	real	T2	parietale	sinistra	beta	14
2700	47.04	real	T2	parietale	sinistra	beta	15

Tabella 1.1: Dati in formato lungo inerenti alle registrazioni EEG.

- *gruppo* di appartenenza del soggetto; variabile qualitativa dicotomica che indica l'appartenenza ad uno dei due gruppi, sham oppure real; in particolare al gruppo real viene effettuata la tACS mentre al gruppo sham la tRNS;
- *tempo* di registrazione del dato EEG; variabile qualitativa con tre modalità: T0, T1 e T2 (vedi sezione 1.4.1);
- *area*, ossia la localizzazione dell'elettrodo che registra le onde cerebrali; variabile qualitativa con tre modalità: frontale, motoria e parietale;
- *parte*: ulteriore suddivisione della variabile area, con due modalità destra e sinistra;
- *tipo* di onda registrata; variabile qualitativa con 5 modalità: delta, beta, alpha1, alpha2 e theta.

Variabile risposta

La variabile risposta è la registrazione EEG, denominata *valori* nella Tabella 1.1. I tracciati riportati sono privi di artefatti (De Zen, 2019), in quanto ripuliti mediante il filtro passa-banda (1-30 Hz) e l'analisi delle componenti indipendenti (ICA). Le onde sinusoidali vengono scomposte in sotto-componenti mediante l'algoritmo Fast Fourier Transform (FFT), calcolando la densità di potenza spettrale per tutte le frequenze. Nel dataset vengono riportate le potenze relative calcolate mediante il rapporto tra la potenza spettrale nell'intervallo di frequenza analizzato e la potenza dell'intero spettro (1-30 Hz). Si tratta quindi una variabile quantitativa continua.

1.5.2 Dati questionari e test

Come già evidenziato precedentemente, è presente anche un dataset dove vengono riportate le risposte e i risultati dei pazienti a diversi questionari. Più nello specifico, si possono considerare tre dataset, uno per ogni istante temporale. La Tabella 1.2 si riferisce al tempo T1 ed è formata da 30 osservazioni e 54 variabili. Nella prima colonna vi è l'etichetta con valori da 1 a 15. Nella seconda colonna viene riportato il gruppo di appartenenza del soggetto, se real oppure sham. Le successive 52 colonne riportano i punteggi dei soggetti ottenuti nei vari test. Le altre tabelle riferite al tempo T0 e T2 presentano la stessa struttura.

	soggetto	gruppo	vas.T1	funzionalità	...	PSDI	PST
1	1	real	5	900	...	1.36	14
2	2	real	1	450	...	1.81	26
...
29	14	sham	7	950	..	1.00	10
30	15	sham	NA	NA	..	NA	NA

Tabella 1.2: Dati inerenti al tempo T1, sia del gruppo sham che real. Legenda: NA sta per valore mancante.

I test somministrati si possono suddividere in tre sotto categorie: questionari neuropsicologici, test per la valutazione cognitiva e test clinici. Mediante i questionari neuropsicologici si è interessati a capire l'eventuale presenza di patologie psichiatriche o alterazioni dello stato cognitivo (De Zen, 2019). I questionari somministrati sono:

- Everyday Memory Questionnaire-Revised (EMQ-R): permette di capire quanto sia difficile per il paziente ricordare eventi nella vita quotidiana; più il punteggio è alto più il soggetto ha difficoltà a ricordare. La variabile associata a tale test è *EMQ-R*, variabile quantitativa a valori positivi;
- Brief Symptom Inventory (BSI), utile per capire lo stato di sofferenza psicologica del paziente; alcune delle variabili associate sono: *ossessione-compulsione*, *depressione*, *psicoticoismo*, *ansia*, *ostilità*, *ansia fobica*, *etc*;
- Beck Depression Inventory (BDI), che valuta quanto grave sia la depressione del soggetto; la variabile associata è *BDI*, quantitativa a valori positivi: maggiore è il punteggio più il soggetto è depresso.

- Patient-Reported Outcomes in Cognitive Impairment (PROCOG-P); alcune variabili inerenti al test sono: *affetto*, *perdita di abilità*, *memoria semantica*, *etc.* Più i punteggi sono alti più il soggetto presenta un deterioramento cognitivo;
- State-Trait Anxiety Inventory forma Y (STAI-Y): mira a capire lo stato d'ansia del soggetto; è rappresentato dalla variabile *STAI-Y*, quantitativa, dove maggiore è il punteggio più il soggetto soffre d'ansia (De Zen, 2019).

I test per la valutazione cognitiva si suddividono in:

- Montreal Cognitive Assesment (MoCA): permette di valutare l'attenzione, la concentrazione, la memoria, il linguaggio e le abilità di calcolo del soggetto. La variabile associata ad esso è *MoCA*;
- figura complessa di Rey: tale test è utile per capire le capacità di percezione del soggetto; alcune delle variabili ad esso associate sono: *Time Copy*, il tempo impiegato per copiare le figura, *Time Memo*, il tempo impiegato per memorizzare la figura;
- Trail-Making Test (TMT): mediante le variabili *TMT_A* e *TMT_B* vengono riportate le tempistiche necessarie a svolgere esercizi utili per individuare abilità del soggetto nella pianificazione spaziale durante un compito di tipo visuo-motorio;
- test di apprendimento verbale di Hopkins (HVLT-R): misura la memoria e l'apprendimento verbale del paziente; le variabili inerenti al test sono: *HVLT-R 1*, *HVLT-R 2*, *HVLT-R 3* e *HVLT-R tot*; rappresentano la ripetizione del test per tre volte, più la somma totale dei punteggi ottenuti in tali test;
- test di fluenza verbale: mira ad analizzare le capacità di evocazione verbale del paziente; nel dataset è rappresentato dalle variabili *fluena fonemica*.

I test clinici invece indagano sullo stato di salute del paziente. Uno dei test più significativi è rappresentato dalla variabile quantitativa *VAS* già introdotta precedentemente (vedi sezione 1.4.1). Permette di avere un'idea complessiva dell'intensità del dolore provato dal paziente: 0 corrisponde a nessun dolore mentre 10 corrisponde a forte dolore.

1.5.3 Obiettivo dello studio

Lo scopo principale di questo studio è verificare se la tACS, applicata ai soggetti con dolore cronico, possa migliorare la qualità della vita dei pazienti. Mediante il dataset delle registrazioni EEG (vedi sezione 1.5.1) si vuole analizzare se in tempi diversi e per i due diversi tipi di

trattamenti le onde registrate sono differenti. Utilizzando il dataset dei risultati dei questionari (vedi sezione 1.5.2), si è intenzionati a capire se ci sono miglioramenti nei punteggi ottenuti nei vari test, tenendo conto del tipo di trattamento praticato ai due gruppi di soggetti.

Capitolo 2

Analisi descrittive

Per una prima analisi esplorativa del dataset delle registrazioni EEG (vedi sezione 1.5.1) si è deciso di rappresentare graficamente le frequenze EEG, dividendole per tipologia di onda e area del cervello. Risultano così 30 grafici; tuttavia verranno riportati solamente quelli più rilevanti, inerenti alle onde theta (Figura 2.1), alpha1 (Figura 2.2) e alpha2 (Figura 2.3). Anche per il dataset dei questionari (vedi sezione 1.5.2) non verranno riportati tutti i grafici ottenuti ma solamente quelli relativi a test di maggiore interesse per la valutazione cognitiva (Figura 2.4), al questionario Brief Symptom Inventory (Figura 2.5) e alla scala del dolore VAS (Figura 2.6). È da evidenziare il fatto che quattro pazienti non hanno preso parte all'intero studio, ritirandosi dopo le prime settimane. In particolare i dati del gruppo real (tACS) sono disponibili su 14 soggetti mentre quelli del gruppo sham (tRNS) su 12 soggetti.

2.1 Onde cerebrali

I grafici seguenti riportano il valore mediano, segnato con un asterisco, delle bande di frequenza al tempo T0, T1 e T2; in rosso è evidenziato il gruppo real mentre in nero quello sham.

La Figura 2.1 evidenzia che per alcuni gruppi sembra esserci una diminuzione della banda theta al tempo T1 rispetto al tempo T0 considerando le diverse zone del cervello. In particolare per il gruppo sham tale diminuzione si nota nelle zone frontale destra, frontale sinistra e parietale sinistra. Per il gruppo real invece si nota una diminuzione della banda nelle aree frontale, motoria sinistra e parietale sinistra. Ricordando l'associazione dimostrata tra dolore cronico e bande a bassa frequenza come quella theta, già accennata nella sezione 1.2.2, è d'interesse verificarne una significativa diminuzione.

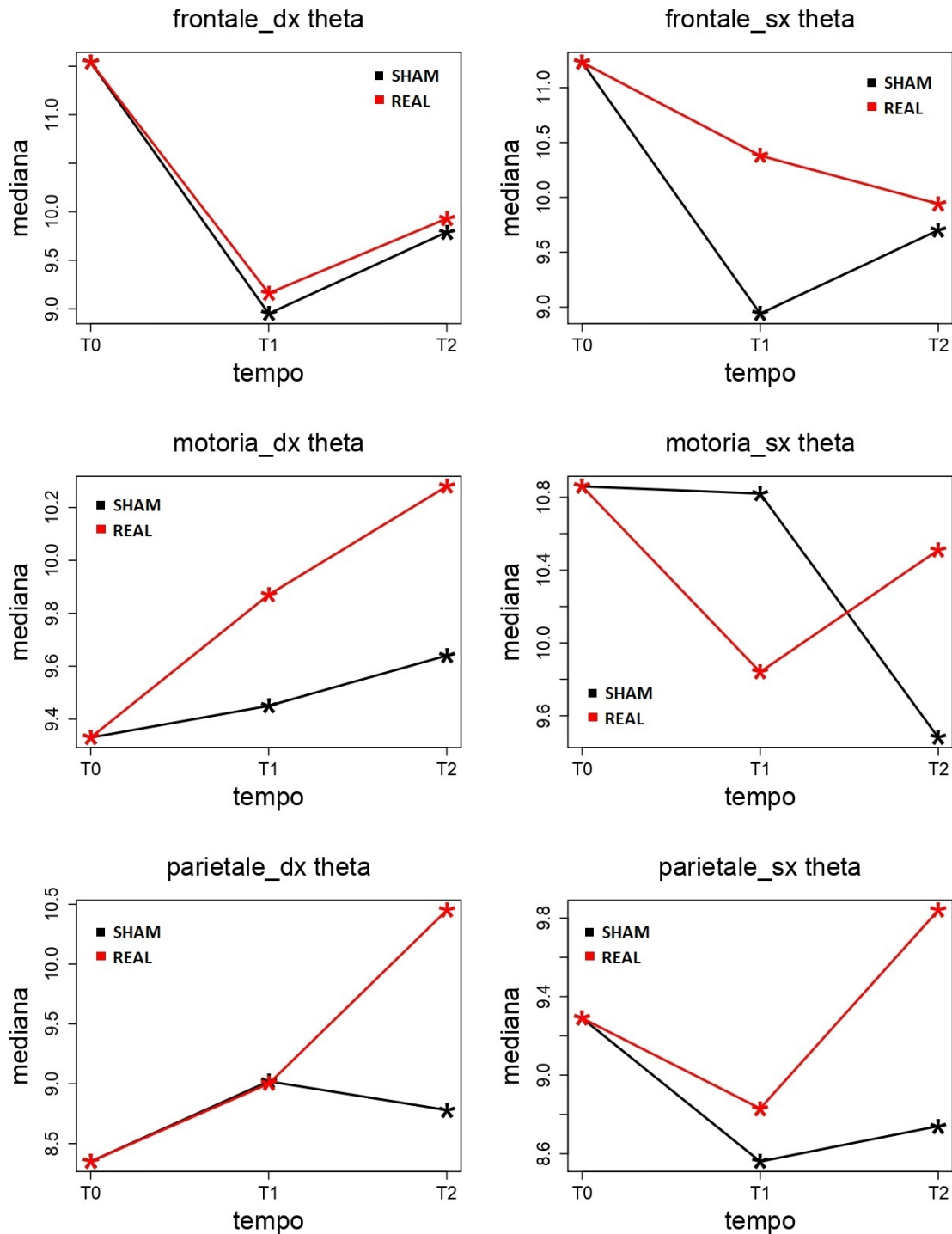


Figura 2.1: Grafici inerenti alla banda theta nelle aree del cervello.

Dalla Figura 2.2 si nota un aumento della banda alpha1 per il gruppo sham in tutte le zone sia confrontando il tempo T0 con il tempo T1 che confrontando il tempo T0 con il tempo T2. Anche i valori registrati per il gruppo real aumentano: sarà quindi d'interesse capire se mediante l'applicazione della tACS si sono ottenuti risultati migliori e diversi da quelli del gruppo sham. La Figura 2.3, che riporta i valori della banda alpha2, evidenzia un aumento al tempo T2 rispetto al tempo T0 del gruppo sham in tutte le zone; per il gruppo real invece

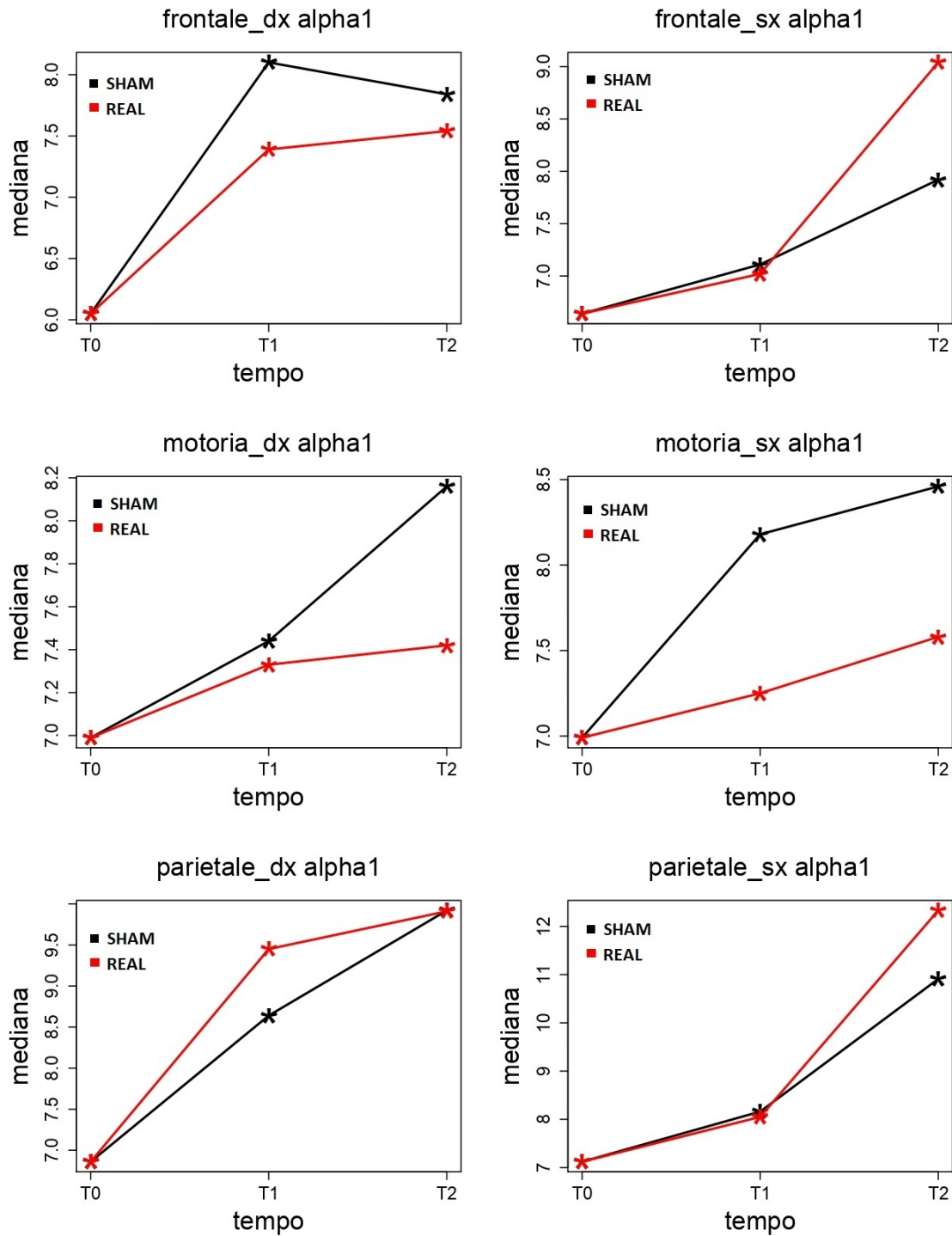


Figura 2.2: Grafici inerenti alla banda alpha1 nelle aree del cervello.

l'aumento si nota al tempo T1 rispetto al tempo T0.

Nel lavoro di De Zen (2019) viene affermato che la maggior parte dei pazienti dello studio al tempo T0 ha come onda prevalente quella theta ossia quella associata al dolore cronico. L'aumento delle onde alpha1 e alpha2, ritenute onde veloci, è coerente con la diminuzione delle onde più lente theta dopo i trattamenti tACS, tRNS e la riabilitazione fisica; da queste prime analisi esplorative sembrerebbe quindi che i trattamenti applicati riducano il dolore nel

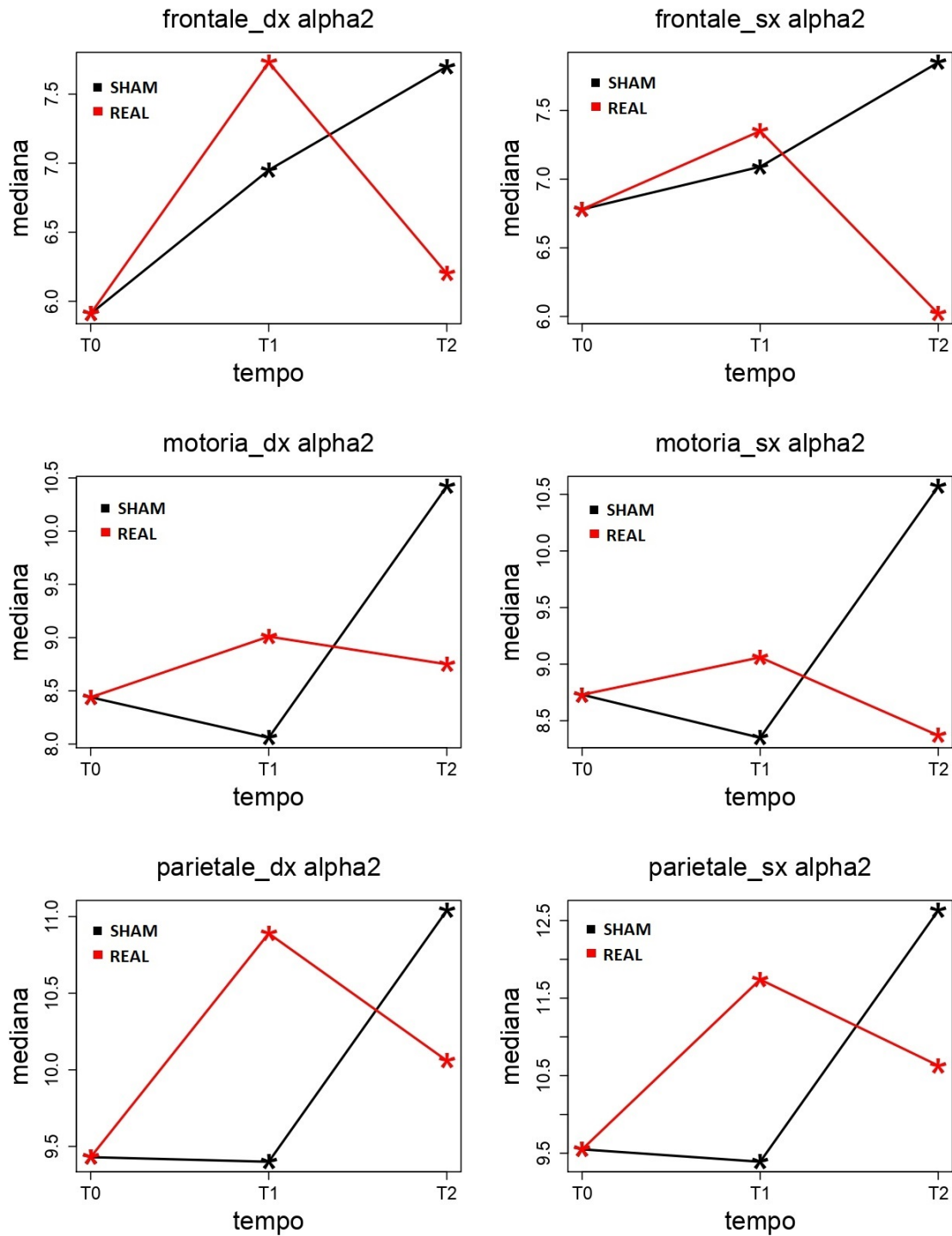


Figura 2.3: Grafici inerenti alla banda alpha2 nelle aree del cervello.

paziente. Verranno adottati nel capitolo successivo gli strumenti adatti ad analizzare questi risultati, concentrandosi soprattutto nel trattamento a corrente alternata.

2.2 Risultati di questionari e test

Le Figure 2.4, 2.5 e 2.6 riportano l'analisi grafica delle variabili: *MoCA*, *TMT_A*, *fluenza fonemica*, *HVLT-R*, *SOM.INDEX*, *DEPR.INDEX*, *ANSIA.INDEX*, *PARA.INDEX* e *VAS*. Vengono rappresentati i valori mediani, segnati con un asterisco, al tempo T0, T1 e T2, suddivisi per i due gruppi real (tACS) in rosso e sham (tRNS) in nero.

La Figura 2.4 riporta i grafici dei punteggi ottenuti dai pazienti nei test cognitivi. Il primo grafico è inerente alla variabile *MoCA*, che valuta l'attenzione, la concentrazione e la memoria del soggetto. L'aumento al tempo T1 rispetto al tempo T0 dei valori mediani osservati viene interpretato come un miglioramento del sistema cognitivo dei soggetti; è da notare che al tempo T2 si ha un peggioramento per i pazienti del gruppo sham. Il secondo grafico riporta il valore

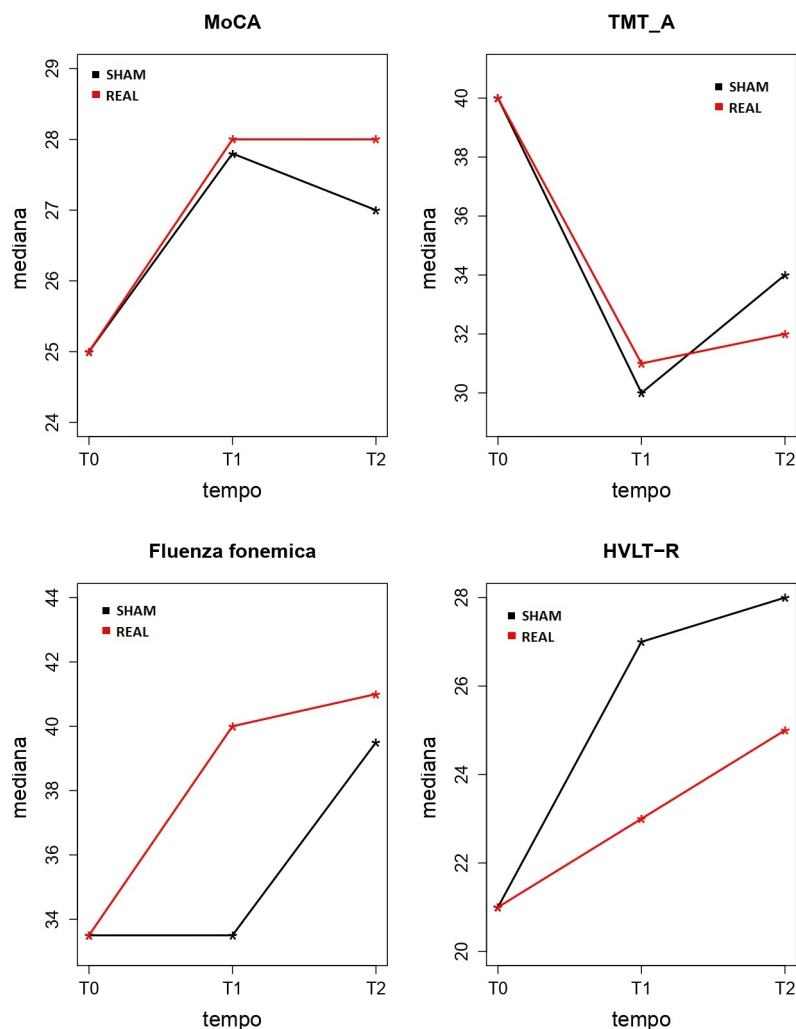


Figura 2.4: Grafici inerenti ad alcuni dei punteggi ottenuti nei test cognitivi.

mediano delle tempistiche nel Trail-Making Test (*TMT_A*): al tempo T1 per entrambi i gruppi le tempistiche impiegate nello svolgere il test diminuiscono rispetto a T0 e aumentano poi

passando da T1 a T2. Il grafico in basso a sinistra riporta il punteggio ottenuto nella variabile *fluenza fonemica*; i valori medi del gruppo real sono più alti di quelli ottenuti nel gruppo sham: sembrerebbe che il gruppo trattato con tACS sia migliorato di più. L'ultimo grafico riporta i valori del test di apprendimento verbale di Hopkins (*HVLT-R*). Entrambi i gruppi sembrano migliorare col passare del tempo tuttavia il gruppo sham sembra perfezionare la memoria e l'apprendimento verbale di più rispetto al gruppo real.

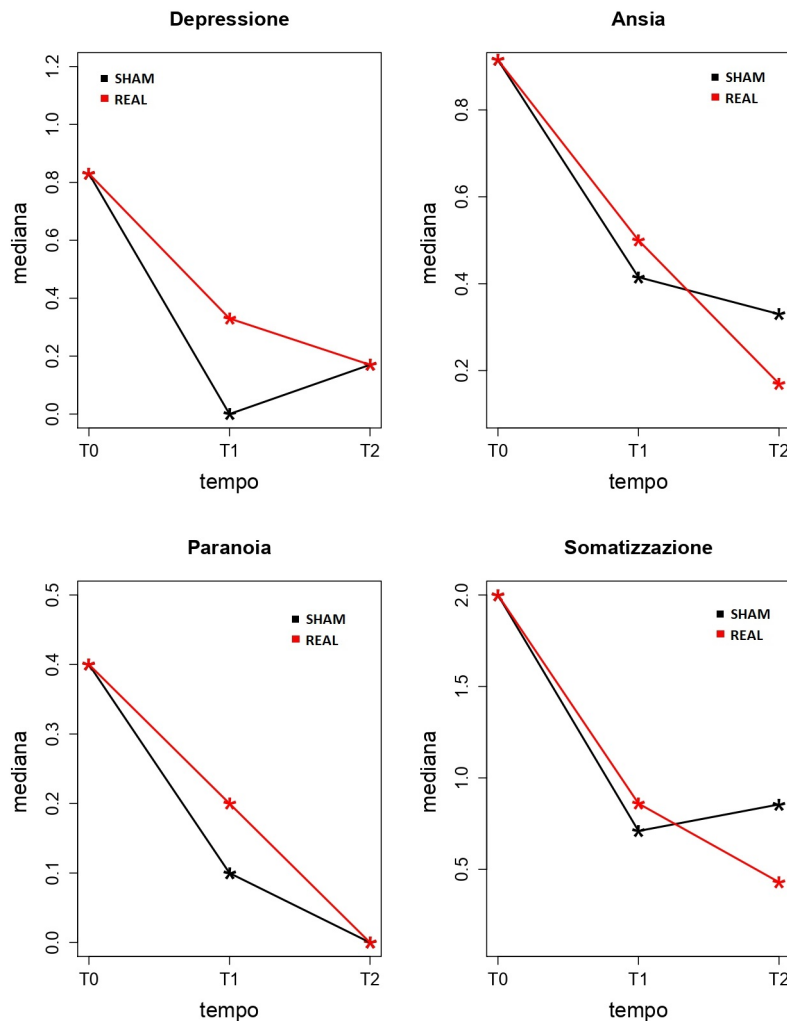


Figura 2.5: Grafici inerenti al il test BSI.

La Figura 2.5 riporta alcuni punteggi ottenuti nel test BSI, che indaga sullo stato di sofferenza psicologica del paziente. Più in particolare il test si basa su domande come “ in che misura è stato disturbato da ?” alle quali viene risposto con punteggi da 0 (assolutamente no) a 4 (molto). Si vuole verificare quanto il paziente soffra di depressione, ansia, ansia fobica, ostilità, paranoia, somatizzazione, etc. Come si può notare i pazienti di entrambi i gruppi sembrano alleviare i propri disturbi. Gli indici inerenti a depressione e somatizzazione, cioè una sensazione

di debolezza, dolore al cuore, nausea e difficoltà a respirare, diminuiscono per il gruppo real, mentre per il gruppo sham diminuiscono al tempo T1 rispetto a T0, per poi aumentare.

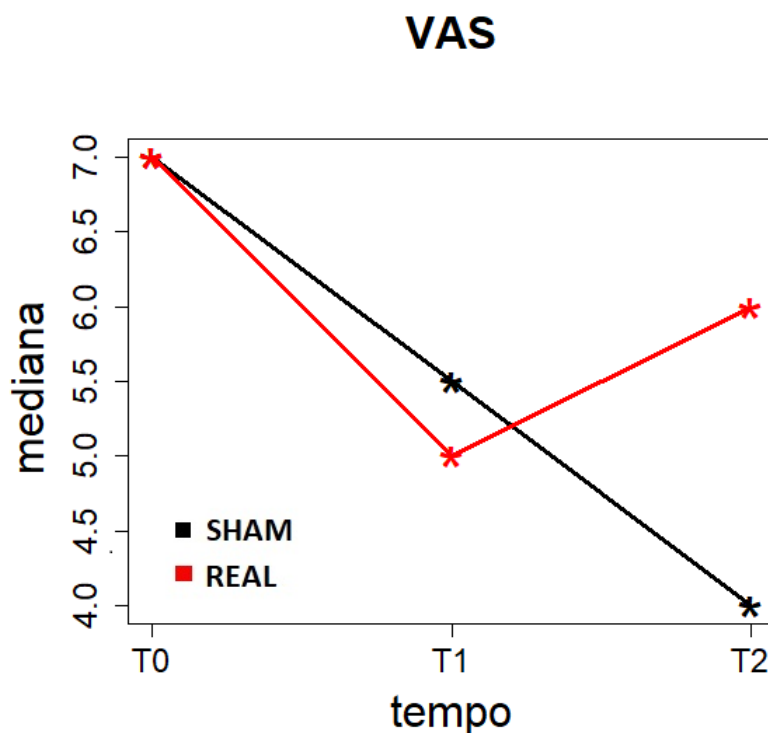


Figura 2.6: Grafico inerenti alla scala del dolore VAS.

La Figura 2.6 riporta la variabile *VAS*, una tra le valutazioni dei test clinici, che esprime l'intensità del dolore provato dal paziente. I valori minori o uguali a 3 significano un dolore lieve, mentre per valori maggiori il dolore aumenta fino a diventare anche di intensità elevata. Già ad una prima analisi per il gruppo real si nota un aumento del dolore al tempo T2 dopo la diminuzione ottenuta al tempo T1. Per il gruppo sham invece la diminuzione del dolore continua anche al tempo T2 passando da un valore mediano 7 (tempo T0) a 4 (tempo T2).

Capitolo 3

Inferenza

Nel presente capitolo vengono introdotti teoricamente il test con segno di Wilcoxon per dati appaiati e il modello lineare normale con effetti misti. Tali metodologie sono state applicate ai dati analizzati in questa tesi, riportando i risultati conseguiti di maggiore importanza.

3.1 Test con segno di Wilcoxon per dati appaiati

Il test con segno di Wilcoxon è un test non parametrico, utilizzato anche in esperimenti con dati appaiati, ed è utile al ricercatore per stabilire se uno o più trattamenti sono efficaci oppure migliori di altri. Solitamente viene utilizzato il test t per dati appaiati, tuttavia tale test assume che le differenze tra coppie siano distribuite come una normale (nel caso in esame l'ipotesi di normalità viene rifiutata). Il test di Wilcoxon si può utilizzare dopo aver verificato alcune assunzioni:

- la variabile misurata sui soggetti deve essere qualitativa ordinale oppure quantitativa continua o discreta;
- i dati sono appaiati e provengono dalla stessa popolazione;
- la distribuzione delle differenze tra i due gruppi correlati deve essere di forma simmetrica (Sprenst e Smeeton, 2000).

L'ipotesi nulla del test è che la mediana della differenza tra le coppie delle osservazioni sia nulla, cioè viene testato se la differenza tra le coppie segue una distribuzione simmetrica attorno allo zero. Il test di Wilcoxon utilizza semplici informazioni inerenti alla direzione della differenza tra i dati appaiati e la loro grandezza relativa: da questa differenza deriva quindi il nome “signed-

rank test”, che dà più peso alle coppie di osservazioni che hanno maggiore differenza tra le due condizioni rispetto alle coppie di osservazioni che differiscono meno (Siegel e Castellan, 1956).

3.1.1 Calcolo del test

Si definisce con d_i la differenza di ogni osservazione tra dati appaiati, con $i = 1, 2, \dots, n$, n numero di “coppie” presenti nell’esperimento. Successivamente, viene considerato il valore assoluto di d_i e ad ognuno di essi viene assegnato il rango iniziando da 1 per il più piccolo, 2 per il secondo valore più piccolo di d_i e così via, fino ad assegnare un rango a tutte le differenze. Viene poi attribuito al rango il segno della differenza e si procede a calcolare W^+ (la somma di tutti i ranghi positivi) e analogamente W^- (la somma di tutti i ranghi negativi). Se l’ipotesi nulla fosse vera, i ranghi associati a variazioni positive dovrebbero essere pressoché pari ai ranghi associati alle variazioni negative e quindi le due somme (W^+ e W^-) dovrebbero essere uguali. Se invece le due somme differissero di molto tra loro, si è costretti a rifiutare l’ipotesi nulla: ciò accade anche quando la somma W^+ o la somma W^- dei ranghi è troppo piccola. Per calcolare il test, si procede scegliendo $W = \min(W^+, W^-)$ e, servendosi delle tavole dei valori critici per il test di Wilcoxon (Tabella 3.1), si trova la probabilità di osservare il valore W . Cioè se una statistica test W osservata è uguale o inferiore al valore indicato nel corpo della Tabella 3.1, sotto un particolare livello di significatività per il valore osservato di N , l’ipotesi nulla può essere respinta a tale livello.

Ties

Se non ci sono differenze tra i due dati appaiati si otterrà d_i pari a 0: coppie di questo tipo vengono eliminate dalle analisi. Un’altra tipologia di “Ties” consiste nell’avere due o più differenze uguali : ad ogni d_i verrà assegnata la media dei ranghi che sarebbero stati assegnati se le differenze fossero state diverse. Ad esempio considerando tre valori di differenze: $d_1 = -1$, $d_2 = 1$ e $d_3 = 1$ ad ognuna viene assegnato il rango 2, poiché $\frac{1+2+3}{2} = 2$. Continuando, alla differenza $d_4 = 2$ viene assegnato il rango 4, poiché i ranghi 1, 2, 3 sono già stati utilizzati.

3.1.2 Esempio del test di Wilcoxon

A titolo esemplificativo si possono considerare due campioni di registrazione EEG della banda di frequenza theta nella localizzazione frontale destra al tempo T0 e T1. Nella Tabella 3.2 vengono riportati i valori dei due campioni nelle prime due colonne “T0” e “T1”. Sotto le diciture “ d_i ” e “ $|d_i|$ ” vengono riportati rispettivamente i valori della differenza tra T1 e T0 e il

N	0.05	0.02	0.01
6	0	–	–
7	2	0	–
8	4	2	0
9	6	3	2
10	8	5	3
11	11	7	5
12	14	10	7
13	17	13	10
14	21	16	13
15	25	20	16
16	30	24	20
17	35	28	23
18	40	33	28
19	46	38	32
20	52	43	38

Tabella 3.1: Valori critici di W nel test di Wilcoxon per dati appaiati (Siegel e Castellan 1956).

valore assoluto di tale differenza. Il rango si ottiene ordinando le differenze in valore assoluto e assegnando 1 al valore più piccolo fino a 14 per il valore più grande. Vengono poi calcolati $W^- = 13 + 6 + 9 + 2 + 14 + 11 + 10 + 5 + 12 + 8 = 90$ e $W^+ = 1 + 7 + 4 + 3 = 15$. La statistica test W osservata è: $W = \min(W^+, W^-) = 15$. Essendo il numero di coppie 14, riferendosi alla Tabella 3.1, il valore W osservato è inferiore al valore critico 16 e maggiore del valore critico 13. L'ipotesi nulla che la mediana delle differenze sia pari a 0 può essere rifiutata con un livello di significatività osservato compreso tra 0.01 e 0.02 (p-value 0.017 utilizzando RStudio). Ciò è coerente con il fatto che la maggioranza dei valori al tempo T1 (10 su 14) diminuiscono e le differenze relative ai valori che aumentano hanno rango 1, 3, 4 e 7.

T0	T1	d_i	$ d_i $	Rango	Segno
12.35	9.06	-3.29	3.29	13	-
5.91	4.66	-1.25	1.25	6	-
7.58	5.02	-2.56	2.56	9	-
9.39	9.58	0.19	0.19	1	+
9.96	9.54	-0.42	0.42	2	-
12.54	8.75	-3.79	3.79	14	-
9.89	6.97	-2.92	2.92	11	-
9.29	11.46	2.17	2.17	7	+
17.38	14.57	-2.81	2.81	10	-
9.72	8.83	-0.89	0.89	5	-
14.01	14.78	0.77	0.77	4	+
13.98	10.92	-3.06	3.06	12	-
11.54	9.16	-2.38	2.38	8	-
8.88	9.43	0.55	0.55	3	+

Tabella 3.2: Calcolo delle differenze tra i valori al tempo T1 e i valori al tempo T0 dell'onda cerebrale theta.

3.1.3 Applicazione al caso di studio

Il test con segno di Wilcoxon per dati appaiati è stato utilizzato per analizzare i valori delle onde cerebrali e di alcuni questionari mettendoli a confronto nei diversi tempi e per le due tipologie di trattamenti. Il software RStudio permette di calcolare il test con segno di Wilcoxon mediante il comando:

```
wilcox.test(campione1,campione2,paired=TRUE)
```

Onde cerebrali

Il dataset delle registrazioni EEG può anche essere visto in formato largo, come nella Tabella 3.3, composto da 180 colonne che riportano le onde cerebrali dei 15 pazienti. Ad esempio la prima colonna (senza considerare la colonna che indica il soggetto) della Tabella 3.3 riporta i dati inerenti al gruppo sham, al tempo T0, effettuati nella zona del cervello frontale destra e per la tipologia di onda delta. Poichè vi sono due gruppi (sham e real), tre diversi tempi (T0, T1 e T2), sei zone del cervello (frontale destra e sinistra, motoria destra e sinistra e parietale destra e sinistra) e cinque tipologie di onde (delta, theta, alpha1, alpha2 e beta) si ottengono $2 \times 3 \times 6 \times 5 = 180$ colonne.

soggetto	sham	sham	...	real	real
	T0	T0		T2	T2
	frontale	fontale		parietale	parietale
	destra	destra		sinistra	sinistra
	delta	theta		alpha2	beta
1	26.54	12.35	...	23.52	25.31
2	15.73	5.91	...	36.13	36.02
...
14	43.62	11.54	...	10.63	27.86
15	42.48	8.88	...	8.58	47.04

Tabella 3.3: Dati delle registrazioni EEG in formato largo.

Considerando solo il gruppo real, è stato applicato il test con segno di Wilcoxon, per confrontare i valori al tempo T1 rispetto al tempo T0, al tempo T2 rispetto al tempo T0 e al tempo T2

rispetto al tempo T1. Sono stati effettuati quindi 90 test uno per ogni tipologia di onda e area del cervello ($5 \times 6 = 30$ test) per tre confronti diversi ($30 \times 3 = 90$ test).

I livelli di significatività osservati sono riportati nella Tabella 3.4, sotto la dicitura “ REAL”. Gli stessi confronti sono stati effettuati anche per il gruppo sham (Tabella 3.4, “SHAM”).

Nella Tabella 3.4 sono stati evidenziati in grassetto i p-value inferiori a 0.05. Per il gruppo real

onda	area	REAL			SHAM		
		T0-T1	T0-T2	T1-T2	T0-T1	T0-T2	T1-T2
δ	fd	0.626	0.153	0.326	0.970	0.266	0.910
θ	fd	0.017	0.241	0.296	0.037	0.204	0.204
α_1	fd	0.091	0.583	0.391	0.784	0.380	0.424
α_2	fd	0.091	0.132	0.900	0.519	0.092	0.012
β	fd	0.715	0.715	0.808	0.677	0.519	0.176
δ	fs	0.583	0.167	0.296	0.733	0.850	0.910
θ	fs	0.173	0.119	0.706	0.380	0.470	0.339
α_1	fs	0.153	0.855	1.000	0.424	0.791	0.677
α_2	fs	0.490	0.855	0.952	0.850	0.129	0.092
β	fs	0.326	0.502	0.502	0.519	0.176	0.519
δ	md	0.296	0.463	0.583	0.622	0.970	0.970
θ	md	0.268	0.358	0.241	0.233	0.129	0.910
α_1	md	0.025	0.153	0.426	0.519	0.301	0.380
α_2	md	0.715	0.173	0.583	0.910	0.077	0.034
β	md	0.358	0.463	0.808	0.233	0.129	0.176
δ	ms	0.173	0.715	0.510	0.470	0.569	0.301
θ	ms	0.135	0.502	0.326	0.677	0.064	0.339
α_1	ms	0.025	0.326	0.903	0.064	0.176	0.791
α_2	ms	0.952	0.358	0.502	0.677	0.151	0.021
β	ms	0.194	0.683	0.715	0.301	0.380	0.970
δ	pd	0.761	0.952	1.000	0.339	0.677	0.850
θ	pd	0.903	0.855	0.808	0.301	0.380	0.470
α_1	pd	0.035	0.346	0.761	0.110	0.410	0.970
α_2	pd	0.761	0.889	0.391	0.622	0.266	0.970
β	pd	0.583	0.187	0.808	0.424	0.042	0.519
δ	ps	0.241	0.426	0.217	0.622	0.470	0.733
θ	ps	0.268	0.638	0.194	0.301	0.027	0.677
α_1	ps	0.217	0.326	0.761	0.367	0.204	0.519
α_2	ps	0.903	0.583	0.903	0.850	0.176	0.450
β	ps	0.426	0.761	0.626	0.470	0.266	0.424

Tabella 3.4: Livello di significatività osservato del test con segno di Wilcoxon. Legenda onde: δ =delta; θ =theta; α_1 =alpha1; α_2 =alpha2; β =beta. Legenda area: fd=frontale destra; fs=frontale sinistra; md=motoria destra; ms=motoria sinistra; pd=parietale destra; ps=parietale sinistra.

vengono segnalate alcune differenze fra campioni confrontando i dati al tempo T1 rispetto al tempo T0 e per alcune tipologie di onde; in particolare vi è una differenza significativa (p-value 0.017) per le onde theta nella zona del cervello frontale destra e per le onde alpha1 nelle zone motoria destra e sinistra e parietale destra (p-value 0.025, 0.025 e 0.035). Nel gruppo sham invece sono state trovate differenze fra campioni:

- al tempo T1 rispetto al tempo T0 per le onde theta nella zona frontale destra (p-value 0.037);
- al tempo T2 rispetto al tempo T0 per le onde theta nella zona parietale sinistra (p-value 0.027) e per le onde beta nella zona parietale destra (p-value 0.042);
- al tempo T2 rispetto al tempo T1 per le onde alpha2 nella zona frontale destra (p-value 0.012) e motoria destra e sinistra (p-value 0.034 e 0.021).

Ai fini dello scopo principale di questa tesi, ossia verificare se l'applicazione della tACS fosse più efficace rispetto alle tRNS, sono stati confrontati i due gruppi real e sham allo stesso tempo T1 e T2. I risultati del test sono riportati nella Tabella 3.5 e non vi sono p-value sufficientemente bassi per rifiutare l'ipotesi nulla che la differenza tra valori real e sham segua una distribuzione simmetrica attorno allo zero.

Test e questionari

Il test con segno di Wilcoxon viene applicato ai punteggi dei questionari e dei test sostenuti dai pazienti, in particolare verranno considerate le stesse variabili della sezione 2.2.2 inerente alle analisi descrittive. Il livello di significatività osservato per ogni test viene riportato nelle Tabelle 3.6 e 3.7.

Per i test cognitivi vengono analizzate le variabili: *Moca*, *TMT_A*, *fluenza fonemica* e *HVLT-R*. Nella variabile *MoCA* viene evidenziato una differenza nel gruppo real fra i valori raccolti al tempo T0 e T2. Nel test di fluenza fonemica risultano alcuni p-value inferiori a 0.05: si notano differenze per il gruppo real confrontando il tempo T0 con il tempo T2 (p-value 0.018) e nel gruppo sham al tempo T2 rispetto al tempo T1 (p-value 0.011). Con un p-value pari a 0.044 risultano essere diversi i valori ottenuti nei gruppi sham e real al tempo T1 (Tabella 3.7). Per la variabile *TMT_A* si rifiuta l'ipotesi nulla del test nel gruppo sham confrontando i tempi T0 e T2. Per la variabile *HVLT-R* sono state rilevate alcune differenze paragonando i tempi T1 e T2 (p-value 0.014) e i tempi T0 e T2 (p-value 0.012) per il gruppo real; nel gruppo sham i valori al tempo T2 sembrano essere differenti da quelli al tempo T0 (p-value 0.015).

		REAL vs SHAM	
onda	area	tempo T1	tempo T2
δ	fd	0.102	0.765
θ	fd	0.465	0.577
α_1	fd	0.966	0.831
α_2	fd	0.415	0.206
β	fd	0.320	0.278
δ	fs	0.175	0.638
θ	fs	0.450	0.577
α_1	fs	0.831	0.320
α_2	fs	0.638	0.365
β	fs	0.465	0.240
δ	md	0.083	0.898
θ	md	0.365	0.520
α_1	md	0.520	0.898
α_2	md	0.831	0.278
β	md	0.175	0.278
δ	ms	0.175	0.240
θ	ms	0.320	0.700
α_1	ms	0.966	0.966
α_2	ms	0.700	0.365
β	ms	0.577	1.000
δ	pd	0.520	0.700
θ	pd	0.577	0.831
α_1	pd	1.000	0.638
α_2	pd	0.898	0.365
β	pd	0.638	0.638
δ	ps	0.175	0.966
θ	ps	0.365	0.465
α_1	ps	0.577	1.000
α_2	ps	0.700	0.413
β	ps	0.413	0.320

Tabella 3.5: Livelli di significatività osservati ottenuti confrontando i due gruppi real e sham al tempo T1 e T2. Legenda onde: δ =delta; θ =theta; α_1 =alpha1; α_2 =alpha2; β =beta. Legenda area: fd=frontale destra; fs=frontale sinistra; md=motoria destra; ms=motoria sinistra; pd=parietale destra; ps=parietale sinistra.

Nei punteggi del test BSI, appartenente ai questionari neuropsicologici, vengono analizzate le variabili depressione, ansia, paranoia e somatizzazione. Non vengono riscontrate differenze significative per i due gruppi real e sham (Tabella 3.7) e il miglioramento che si era notato durante l'analisi descrittiva (Figura 2.5) non sembra essere considerevole. Unici p-value che

Test-Questionario	REAL			SHAM		
	T0-T1	T0-T2	T1-T2	T0-T1	T0-T2	T1-T2
MoCA	0.054	0.013	0.372	0.058	0.165	0.610
TMT_A	0.844	0.310	0.329	0.070	0.040	0.950
fluenza f.	0.102	0.018	0.780	0.305	0.074	0.011
HVLT-R	0.132	0.012	0.014	0.125	0.015	0.373
Depressione	0.075	0.066	0.235	0.075	0.059	0.943
Ansia	0.213	0.284	0.929	0.017	0.064	0.324
Paranoia	0.320	0.235	0.439	0.069	0.397	0.461
Somatizzazione	0.018	0.026	0.477	0.014	0.014	0.530
VAS	0.013	0.146	0.552	0.056	0.064	0.722

Tabella 3.6: Livello di significatività osservato nei confronti fra tempi diversi. Legenda: fluenza f. sta per fluenza fonemica.

Test-Questionario	REAL vs SHAM	
	tempo T1	tempo T0
MoCA	0.440	0.550
TMT_A	0.260	0.413
fluenza f.	0.044	0.953
HVLT-R	0.258	0.158
Depressione	0.610	0.892
Ansia	0.414	0.575
Paranoia	0.462	0.684
Somatizzazione	0.813	0.594
VAS	0.990	0.394

Tabella 3.7: Livello di significatività osservato nei confronti fra gruppi real e sham. Legenda: fluenza f. sta per fluenza fonemica.

permettono di rifiutare l'ipotesi di uguaglianza dei campioni si ottengono in entrambi i gruppi per la variabile somatizzazione (Tabella 3.6) e per la variabile ansia nel gruppo sham, confrontando il tempo T0 con il tempo T1. Per la scala del dolore VAS invece sono stati trovati alcuni risultati: si nota infatti che solo per il gruppo real il dolore provato sembra diminuire (p-value 0.013) confrontando il tempo T0 con il tempo T1. Paragonando i valori del gruppo real con quelli del gruppo sham non vengono però evidenziate differenze nel miglioramento.

Correzione per test multipli

Il numero di test eseguiti utilizzando i valori EEG è pari a 240. Si è precedentemente deciso di rifiutare l'ipotesi nulla di ogni singolo test che avesse un livello di significatività osservato inferiore a 0.05. Svolgere così tanti test simultaneamente porta a commettere errori con una

probabilità molto più alta di quella che ci si aspetterebbe, rifiutando l'ipotesi nulla anche quando questa in realtà è vera. Ciononostante si è deciso di non applicare alcuna correzione ai test effettuati in quanto le ipotesi nulle rigettate sono poche. Applicando ad esempio la correzione di Bonferroni, il rifiuto dell' i -esima ipotesi nulla può avvenire se l' i -esimo p-value è minore di $\frac{\alpha}{m}$, dove $\alpha = 0.05$ solitamente e m è il numero totale di test effettuati (Goeman e Solari, 2011). È evidente che in questo ultimo caso nessuna ipotesi nulla verrebbe rifiutata.

3.2 Modello lineare normale ad effetti misti

Il modello lineare normale ad effetti misti viene applicato solo al dataset inerente alle registrazioni EEG i cui valori sono su scala continua.

I dati considerati in questa tesi hanno una struttura multilivello: vengono infatti effettuate registrazioni EEG ripetute su 15 soggetti assegnati a 2 diversi trattamenti (tACS o tRNS). I modelli con effetti casuali sono in grado di rappresentare la struttura multilivello sopra descritta e tengono conto del fatto che la variabile risposta per ciascuna unità è multivariata e deve essere analizzata come realizzazione di un vettore casuale con componenti dipendenti. Le osservazioni su unità statistiche diverse saranno considerate indipendenti. L'assunzione principale dei modelli con effetti misti è che vi sono alcune caratteristiche non osservabili comuni a tutte le osservazioni relative ad una stessa unità. In generale viene definito con y_{ij} l'osservazione j -esima per l' i -esima unità, $i = 1, \dots, n$, $j = 1, \dots, m$. Per ogni soggetto sono così disponibili m rilevazioni: in totale si hanno $N = n \times m$ osservazioni (Agresti, 2015). Con $\mathbf{y}_i = (y_{i1}, \dots, y_{im})^T$ viene indicato il vettore delle osservazioni sull' i -esima unità statistica. Il vettore riga p -dimensionale delle variabili esplicative per l'osservazione j -esima sull'unità i -esima è indicato con \mathbf{x}_{ij} .

Un modello lineare normale con effetti misti può essere scritto nella forma:

$$Y_{ij} = \mathbf{x}_{ij}\beta + \mathbf{z}_{ij}\mathbf{u}_i + \epsilon_{ij}, \quad (3.1)$$

dove β è un vettore p -dimensionale di effetti fissi, $\mathbf{u}_i \sim N_q(0, \Sigma_u)$ è un vettore q -dimensionale di effetti casuali e ϵ_{ij} è marginalmente distribuito come $N(0, \sigma_\epsilon^2)$, indipendente da \mathbf{u}_i . Il modello per Y_{ij} è composto da $\mathbf{x}_{ij}\beta = \mu_{ij} = E(Y_{ij})$, dal termine $\mathbf{z}_{ij}\mathbf{u}_i$ che rappresenta la variabilità tra le unità e ϵ_{ij} che descrive la variabilità interna alle unità (Agresti, 2015). In termini matriciali il modello può anche essere scritto come:

$$\mathbf{Y}_i = \mathbf{X}_i\beta + \mathbf{Z}_i\mathbf{u}_i + \epsilon_i, \quad (3.2)$$

con \mathbf{X}_i matrice del disegno $m \times p$ per l'unità i -esima, avente come riga j -esima \mathbf{x}_{ij} , \mathbf{Z}_i è la matrice del modello $m \times q$ degli effetti casuali avente come j -esima riga \mathbf{z}_{ij} e $\epsilon_i \sim N(0, \sigma_\epsilon^2 \mathbf{I}_m)$. Condizionatamente agli effetti casuali

$$E(\mathbf{Y}_i | \mathbf{u}_i) = \mathbf{X}_i \beta + \mathbf{Z}_i \mathbf{u}_i, \quad (3.3)$$

ossia la forma di un modello lineare con $\mathbf{Z}_i \mathbf{u}_i$ come offset: gli effetti fissi sono interpretabili a livello di unità statistica solo a parità di effetto casuale. Marginalmente invece $\mathbf{Y}_i \sim N_m(\mathbf{X}_i \beta, V_i)$ dove $V_i = \text{Var}(\mathbf{Y}_i) = \mathbf{Z}_i \Sigma_u \mathbf{Z}_i^T + \sigma_\epsilon^2 \mathbf{I}_m$, in particolare $\sigma_\epsilon^2 \mathbf{I}_m$ esprime la variabilità entro le unità mentre $\mathbf{Z}_i \Sigma_u \mathbf{Z}_i^T$ esprime la variabilità tra le unità. La stima dei parametri β e delle componenti ignote di Σ_u e $\sigma_\epsilon^2 \mathbf{I}_m$ si ottiene mediante il metodo della massima verosimiglianza. Lo stimatore di massima verosimiglianza di β con V_i, \dots, V_n note ha la forma :

$$\hat{\beta} = (\mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-1} (\mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{Y}) = \left(\sum_{i=1}^n \mathbf{X}_i^T V_i^{-1} \mathbf{X}_i \right)^{-1} \left(\sum_{i=1}^n \mathbf{X}_i^T V_i^{-1} \mathbf{Y}_i \right), \quad (3.4)$$

dove:

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} \mathbf{X}_1 \\ \vdots \\ \mathbf{X}_n \end{pmatrix}, \quad \mathbf{Y} = \begin{pmatrix} \mathbf{Y}_1 \\ \vdots \\ \mathbf{Y}_n \end{pmatrix} \quad e \quad \mathbf{V} = \begin{pmatrix} V_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & V_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & V_n \end{pmatrix}. \quad (3.5)$$

Lo stimatore $\hat{\beta}$ distribuisce come una normale di media β e matrice di covarianza

$$\text{Var}(\hat{\beta}) = (\mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-1} = \left(\sum_{i=1}^n \mathbf{X}_i^T V_i^{-1} \mathbf{X}_i \right)^{-1}. \quad (3.6)$$

Nella maggior parte dei casi V_i non è nota e va stimata assieme a $\hat{\beta}$.

3.2.1 Modello lineare con intercetta casuale

Un sotto caso speciale dei modelli lineari misti si ottiene ponendo nel modello $\mathbf{u}_i = u_i$, $\mathbf{Z}_i = \mathbf{1}$ e $\text{var}(u_i) = \sigma_u^2$ ossia:

$$\mathbf{Y}_i = \mathbf{X}_i \beta + u_i \mathbf{1} + \epsilon_{ij}. \quad (3.7)$$

u_i rappresenta l'effetto del soggetto i -esimo e si assume $u_i \sim N(0, \sigma_u^2)$ indipendenti da ϵ_{ij} . Marginalmente per questa tipologia di modelli $E(\mathbf{Y}_i) = \mathbf{X}_i \beta$, $\text{Var}(\mathbf{y}_i) = \sigma_u^2 \mathbf{1} \mathbf{1}^T + \sigma_\epsilon^2 \mathbf{I}$ e per

$j \neq k$

$$\text{corr}(y_{ij}, y_{ik}) = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_u^2 + \sigma_\epsilon^2} \quad (3.8)$$

chiamato anche coefficiente di correlazione intra-classe e rappresenta la quota di varianza totale dovuta alla variabilità delle misure sulla stessa unità (Agresti, 2015).

Confronto fra modelli annidati

In genere lo stimatore di massima verosimiglianza dei parametri che definiscono V_1, \dots, V_n presenta distorsione elevata: si preferisce quindi adottare una stima dei parametri basata sulla verosimiglianza ristretta (*restricted maximum likelihood estimation*). Più precisamente si tratta della verosimiglianza ottenuta dal modello basato su una trasformazione \mathbf{AY} di \mathbf{Y} con densità non dipendente da β : i residui ottenuti sono indipendenti dalla regressione lineare di \mathbf{Y} su \mathbf{X} (Davison, 2003). Tuttavia nel caso di studio esaminato, per valutare la significatività dei coefficienti delle variabili, si è deciso di ricorrere al test del log-rapporto di verosimiglianza per il confronto di modelli annidati, per il quale è necessario utilizzare la massima verosimiglianza non ristretta. Ciò è possibile in quanto viene fatta inferenza solo sugli effetti fissi e non sugli effetti casuali (Agresti, 2015). Il test del log-rapporto di verosimiglianza permette di testare l'ipotesi nulla che uno o più coefficienti del modello siano uguali a zero e che quindi le variabili associate ad essi non siano utili a spiegare la variabile risposta (Pace e Salvan, 1996).

3.2.2 Applicazione al caso di studio

Il modello lineare normale con effetti misti può essere facilmente stimato utilizzando il pacchetto *nlme* (Pinheiro et al., 2018) creato per il software R. Sono stati stimati cinque modelli, uno per ogni tipologia di onda: per semplicità il dataset è stato suddiviso in 5 dataset più piccoli denominati delta, theta, alpha1, alpha2 e beta. Il comando base per la stima del modello è:

```
modello<-lme(valori~tempo+parte+area+gruppo,random=~1|soggetto,
             method = 'ML',data=dataset)
```

Vengono così stimati cinque modelli misti lineari con intercetta casuale (vedi sezione 3.2.1) specificando l'argomento *random=~1*. Il metodo di stima dei parametri utilizzato è quello della massima verosimiglianza (*method='ML'*). Le variabili esplicative considerate sono quelle inerenti al tempo, all'area del cervello e al gruppo. È stato poi utilizzato il test del log-rapporto di verosimiglianza in modo da far emergere le variabili più importanti mediante il comando:

```
drop1(modello,test='Chisq')
```

Onde delta

Il modello finale per le onde delta mantiene i coefficienti relativi all'area del cervello, al gruppo di appartenenza e al tempo.

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data: delta

AIC	BIC	logLik
2549.21	2581.182	-1266.605

Random effects:

Formula: ~1 | soggetto

(Intercept) Residual

StdDev:	8.078612	5.22982
---------	----------	---------

Fixed effects: valori ~ tempo + area + gruppo

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	25.852761	2.2053336	382	11.722835	0.0000
tempoT1	1.474046	0.7550392	382	1.952278	0.0516
tempoT2	-0.431018	0.7550392	382	-0.570855	0.5684
areamotoria	-2.426119	0.6437464	382	-3.768750	0.0002
areaparietale	-4.927164	0.6437464	382	-7.653890	0.0000
grupposham	-1.282241	0.6300682	382	-2.035083	0.0425

Correlation:

	(Intr)	tempT1	tempT2	aremtr	arprt1
tempoT1	-0.185				
tempoT2	-0.185	0.688			
areamotoria	-0.146	0.000	0.000		
areaparietale	-0.146	0.000	0.000	0.500	
grupposham	0.000	-0.369	-0.369	0.000	0.000

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-3.0995823	-0.6022162	-0.1013779	0.5367551	3.6792549

Number of Observations: 402

Number of Groups: 15

Dopo aver stimato il modello iniziale che comprende tutte le variabili, i risultati del test del log-rapporto di verosimiglianza hanno permesso di eliminare la variabile parte (parte sinistra o destra per ogni area del cervello).

Model:

```
valori ~ tempo + parte + area + gruppo
      Df  AIC   LRT   Pr(>Chi)
<none> 2551.2
tempo  2 2558.0 10.772  0.00458 **
parte  1 2549.2  0.026  0.87121
area   2 2602.5 55.328  9.676e-13 ***
gruppo 1 2553.4  4.180  0.04089 *
```

Il livello di significatività osservato relativo all'ipotesi nulla che il coefficiente della variabile parte sia pari a 0 è pari a 0.87121 e quindi l'ipotesi nulla non viene rifiutata. Il p-value può anche essere calcolato mediante i seguenti comandi:

```
m1<-lme(valori~tempo+area+gruppo+parte,random=~1|soggetto,
        method = 'ML',data=delta)
m2<-lme(valori~tempo+area+gruppo,random=~1|soggetto,
        method = 'ML',data=delta)
wp=2*(m1$logLik-m2$logLik)
gdl=1
1-pchisq(wp,gdl)
```

Viene stimato prima il modello $m1$ con tutte le variabili e poi il modello $m2$ senza la variabile parte. La statistica test W , denominata wp , è 2 volte la differenza della log-verosimiglianza fra il modello completo e quello ristretto. La distribuzione nulla asintotica di W è chi-quadrato con gradi di libertà pari al numero di parametri in esame nell'ipotesi nulla. Ripetendo il test per il modello ristretto, risulta:

Model:

```
valori ~ tempo + area + gruppo
      Df  AIC   LRT   Pr(>Chi)
<none> 2549.2
```

```

tempo    2 2556.0 10.771 0.004582 **
area     2 2600.5 55.324 9.693e-13 ***
gruppo   1 2551.4 4.180 0.040901 *

```

e quindi si decide di mantenere le variabili tempo, area e gruppo.

Le analisi appena descritte sono state effettuate anche per le altre onde, ci si limita a riportare in seguito solo i modelli finali ottenuti assieme ad una breve interpretazione dei coefficienti.

Onde theta

Per la banda di frequenza theta i coefficienti significativamente diversi da 0 sono quelli relativi alle variabili tempo e gruppo. Il modello finale è quindi:

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data: theta

AIC	BIC	logLik
1750.349	1774.327	-869.1743

Random effects:

Formula: ~1 | soggetto

(Intercept) Residual

StdDev: 3.037779 1.945154

Fixed effects: valori ~ tempo + gruppo

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	10.893333	0.8147715	384	13.369802	0.0000
tempoT1	-1.038273	0.2801201	384	-3.706529	0.0002
tempoT2	-0.961991	0.2801201	384	-3.434210	0.0007
grupposham	0.492124	0.2337611	384	2.105243	0.0359

Correlation:

(Intr) tempT1 tempT2

tempoT1	-0.186	
tempoT2	-0.186	0.688
grupposham	0.000	-0.369 -0.369

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-4.32647930	-0.54791818	-0.05262341	0.45903705	4.45131231

Number of Observations: 402

Number of Groups: 15

I coefficienti relativi al tempo T1 e T2 sono negativi ed indicano una diminuzione della frequenza dell'onda theta se si passa dal tempo T0 al tempo T1 o dal tempo T0 al tempo T2, fermo restando i valori di tutte le altre variabili esplicative. Analogamente il coefficiente relativo alla variabile gruppo indica che per soggetti che appartengono al gruppo sham le frequenze dell'onda theta aumentano rispetto a quelle dei soggetti del gruppo real, fermo restando tutte le altre variabili esplicative. La terapia tACS sembra attenuare le frequenze delle onde theta, allontanandosi quindi dalle oscillazioni correlate al dolore cronico.

Onde alpha1

Il modello finale per le onde alpha1 mantiene le variabili inerenti al tempo e all'area.

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data: alpha1

AIC	BIC	logLik
2094.661	2122.637	-1040.331

Random effects:

Formula: ~1 | soggetto

(Intercept) Residual

StdDev: 7.884563 2.917838

Fixed effects: valori ~ tempo + area

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	9.225189	2.0821381	383	4.430633	0.0000
tempoT1	0.804043	0.3910548	383	2.056088	0.0405
tempoT2	0.979812	0.3910548	383	2.505563	0.0126
areamotoria	0.409104	0.3587085	383	1.140493	0.2548


```
areaparietale 2.179328 0.3587085 383 6.075486 0.0000
```

Correlation:

```

              (Intr) tempT1 tempT2 aremtr
tempoT1      -0.118
tempoT2      -0.118  0.639
areamotoria  -0.086  0.000  0.000
areaparietale -0.086  0.000  0.000  0.500
```

Standardized Within-Group Residuals:

```

Min          Q1          Med          Q3          Max
-3.38255592 -0.45132358 -0.06499321  0.35338754  5.15545687
```

Number of Observations: 402

Number of Groups: 15

I coefficienti relativi al tempo indicano che le frequenze della banda alpha1 aumentano confrontando il tempo T0 con T1 e T0 con T2, fermo restando il valore delle altre variabili esplicative. La variabile gruppo non viene considerata e quindi non si può affermare che il miglioramento ottenuto sia dovuto all'applicazione della tACS.

Onde alpha2

Nel modello finale per l'onda alpha2 vengono mantenute le stesse variabili del modello relativo all'onda alpha1, ossia tempo e area.

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data: alpha2

```

      AIC      BIC    logLik
2094.771 2122.746 -1040.385
```

Random effects:

Formula: ~1 | soggetto

```

              (Intercept) Residual
StdDev:      6.594277  2.938397
```

Fixed effects: valori ~ tempo + area

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	8.410141	1.7538865	383	4.795145	0.0000
tempoT1	0.519383	0.3938028	383	1.318891	0.1880
tempoT2	1.315344	0.3938028	383	3.340110	0.0009
areamotoria	1.840000	0.3612359	383	5.093624	0.0000
areaparietale	4.347910	0.3612359	383	12.036208	0.0000

Correlation:

	(Intr)	tempT1	tempT2	aremtr
tempoT1	-0.141			
tempoT2	-0.141	0.639		
areamotoria	-0.103	0.000	0.000	
areaparietale	-0.103	0.000	0.000	0.500

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-4.957746015	-0.505843643	-0.003547694	0.403191983	3.564827021

Number of Observations: 402

Number of Groups: 15

Onde beta

Per le onde beta il modello finale considera solo la variabile inerente al tempo.

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data: beta

AIC	BIC	logLik
2639.782	2659.764	-1314.891

Random effects:

Formula: ~1 | soggetto

(Intercept) Residual

StdDev: 7.62914 5.937135

Fixed effects: valori ~ tempo

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	36.19256	2.0746165	385	17.445419	0.0000
tempoT1	-1.32862	0.7935992	385	-1.674169	0.0949
tempoT2	-0.97702	0.7935992	385	-1.231121	0.2190

Correlation:

	(Intr)	tempT1
tempoT1	-0.240	
tempoT2	-0.240	0.639

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-2.3746850	-0.6351642	-0.0462964	0.6373554	4.4771301

Number of Observations: 402

Number of Groups: 15

3.3 Risultati delle analisi

Per quanto riguarda i test effettuati sulle registrazioni delle onde cerebrali i risultati più rilevanti si ottengono per le onde theta, alpha1 e alpha2. Considerando i test non parametrici, le differenze significative, adottando un livello 5%, sono le seguenti:

- le frequenze per la banda theta diminuiscono passando dal tempo T0 al tempo T1 per entrambi i gruppi (zona frontale destra);
- le frequenze per la banda theta e beta diminuiscono paragonando il tempo T0 con il tempo T2 solo per il gruppo sham (zona parietale destra e parietale sinistra);
- i valori relativi alla banda alpha1 aumentano al tempo T1 rispetto al tempo T0 solo nel gruppo real (zona motoria destra e sinistra e parietale destra);
- le frequenze della banda alpha2 aumentano al tempo T2 rispetto al tempo T1 solo per i soggetti del gruppo sham (zona frontale destra e motoria destra e sinistra).

La diminuzione delle onde lente theta e l'aumento delle onde più veloci alpha sono coerenti con le analisi descrittive effettuate all'inizio.

Rivolgendo l'attenzione ai test cognitivi si nota un miglioramento generale dei soggetti con il passare del tempo, per entrambe le terapie; unica differenza riscontrata tra i due gruppi riguarda la variabile fluenza fonemica, indicando che i soggetti trattati con tACS hanno ottenuto punteggi migliori dei soggetti trattati con tRNS. Tuttavia non si può affermare che i soggetti sottoposti a tACS migliorino di più rispetto ai soggetti sottoposti a tRNS.

Per quanto riguarda la stima dei modelli lineari con intercetta casuale la variabile gruppo viene considerata solo per i modelli delle onde delta e theta mentre per gli altri non sembra influire sul comportamento della variabile risposta. La variabile tempo invece viene mantenuta in tutti i modelli mentre i coefficienti della variabile area risultano essere significativamente diversi da zero solo per le onde delta, alpha1 e alpha2. Non si può quindi affermare con certezza che il cambiamento nel tempo delle frequenze delle onde sia diverso in base al trattamento ricevuto.

Conclusioni

Lo scopo principale di questa tesi è verificare se la stimolazione transcranica a corrente alternata sia più efficace rispetto alla stimolazione transcranica a rumore casuale in pazienti che soffrono di dolore cronico. È noto che esiste una relazione tra alcune patologie, ad esempio il Parkinson, e le alterazioni delle frequenze delle onde cerebrali. In particolare, il dolore cronico è correlato all'aumento della presenza della banda theta a discapito delle onde alpha. Per valutare l'efficacia della tACS rispetto alla tRNS è stato utilizzato il test con segno di Wilcoxon. Tramite esso sono state trovate alcune differenze nei campioni relativi alle onde theta, alpha1 e alpha2. La stimolazione transcranica associata all'esercizio fisico sembra quindi alleviare le sensazioni spiacevoli nei soggetti considerati. Tuttavia non vi sono evidenze per poter affermare l'efficacia della stimolazione transcranica a corrente alternata e ciò potrebbe essere causato dalla teoria del "pain-matrix", ossia la mappa corticale correlata al dolore acuto (De Zen, 2019). La cronicizzazione del dolore sembra coinvolgere diffusamente il sistema nervoso centrale in diverse aree e quindi, a causa di questa dispersione, la tACS ottiene un effetto contenuto. A sostegno di questa ipotesi vi è lo studio inerente a pazienti malati di Parkinson (Formaggio et al., 2016), il quale è una patologia localizzata dove la tACS risulta efficace. Interpretando i modelli stimati si nota che con il passare del tempo i soggetti tendono a migliorare, ma non è possibile affermare che ciò sia dovuto alla tipologia di trattamento applicato al soggetto. Per quanto inerente ai punteggi ottenuti nei test cognitivi si nota un miglioramento generale dei soggetti in quanto la variabile *VAS* diminuisce. In fase di analisi esplorativa le sensazioni di ansia e depressione dei pazienti sembrano diminuire. Non si riesce però a dimostrare che ciò sia dovuto alla tACS: nel lavoro di De Zen (2019) viene ribadito spesso come la riabilitazione fisica sia di grande aiuto nel processo di guarigione. L'esercizio fisico rilascia nel sistema nervoso centrale sostanze come oppioidi e serotonina in grado di ridurre disturbi e malessere del soggetto. Si può anche ipotizzare che in realtà la diminuzione della percezione del dolore favorisca una diminuzione di sintomi come depressione oppure, al contrario, socializzare e partecipare ad un programma riabilitativo riduce la depressione e migliora le condizioni di benessere del paziente che a loro

volta potrebbero ridurre la sensazione di dolore. Un problema riscontrato in questo lavoro è la numerosità ridotta del campione soggetta anche ad ulteriori defezioni da parte dei soggetti nel corso dello studio. Risultati migliori si potrebbero trovare in seguito aumentando la numerosità del campione e valutando l'efficacia della tACS e della riabilitazione fisica distintamente.

Bibliografia

- Agresti, Alan (2015). *Foundations of linear and generalized linear models*. John Wiley & Sons, 287–300.
- Berger, Hans (1929). “Über das elektrenkephalogramm des menschen”. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 87, 527–570.
- Bidonde, Julia, Angela J Busch, Candice L Schachter, Tom J Overend, Soo Y Kim, Suelen M Góes, Catherine Boden e Heather JA Foulds (2017). “Aerobic exercise training for adults with fibromyalgia”. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 6, 1465–1858.
- Buzsáki, György e Andreas Draguhn (2004). “Neuronal oscillations in cortical networks”. *Science* 304, 169–195.
- Davison, Anthony Christopher (2003). *Statistical models*. Cambridge University Press, 657–661.
- De Zen, Lorenzo (2019). “Effetti della stimolazione transcranica a corrente alternata in associazione all’esercizio fisico nel trattamento del dolore cronico”. Tesi di Laurea. Univeristà degli Studi di Padova.
- Dubin, Adrienne E. e Ardem Patapoutian (2010). “Nociceptors: the sensors of the pain pathway”. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 3761.
- Fanelli, Guido, Giuseppe Ventriglia, Franca Benini, Claudio Blengini, Cesare Bonezzi, Achille Caputi, Bruno Fusco, Antonio Gatti, Stefano Ivis, Maria Linetti, Pierangelo Aprile, Salvatore Mangione, Mauro Martini, Rita Melotti, Carlomaurizio Montecucco, Giovanni Pittoni, William Raffaeli, Alessandro Sabato, Gianlorenzo Scaccabarozzi, Paolo Spriano, Giuseppe Ventriglia, Vittorina Zagonel, Giovanni Zaninetta e Stefano Zuccaro (2013). “Il dolore cronico in Medicina Generale”. *Disponibile da indirizzo web: www.salute.gov.it (ultimo accesso ottobre 2019)*.
- Formaggio, Emanuela, Stefano Masiero, Anna Bosco, Federica Izzi, Francesco Piccione e Alessandra Del Felice (2016). “Quantitative EEG evaluation during robot-assisted foot movement”. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 25, 1633–1640.

- Goeman, Jelle J e Aldo Solari (2011). “Multiple testing for exploratory research”. *Statistical Science* 26, 584–597.
- Han, Chun-Xiao, Jiang Wang, Guo-Sheng Yi e Yan-Qiu Che (2013). “Investigation of EEG abnormalities in the early stage of Parkinson’s disease”. *Cognitive Neurodynamics* 7, 351–359.
- Kamei, Satoshi, Akihiko Morita, Kan Serizawa, Tomohiko Mizutani e Kaname Hirayanagi (2010). “Quantitative EEG analysis of executive dysfunction in Parkinson disease”. *Journal of Clinical Neurophysiology* 27, 193–197.
- Merskey, Harold (1991). “The definition of pain.” *European psychiatry* 6, 153–159.
- Nitsche, Michael A, Leonardo G Cohen, Eric M Wassermann, Alberto Priori, Nicolas Lang, Andrea Antal, Walter Paulus, Friedhelm Hummel, Paulo S Boggio e Felipe Fregni (2008). “Transcranial direct current stimulation: state of the art 2008”. *Brain Stimulation* 1, 206–223.
- Pace, Luigi e Alessandra Salvan (1996). *Introduzione alla statistica: Inferenza, verosimiglianza, modelli*. Cedam, 140–141.
- Pinheiro, Jose, Douglas Bates, Saikat DebRoy, Deepayan Sarkar e R Core Team (2018). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-137. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R Core Team (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Santos Pinheiro, Eulalia Silva dos, Fernanda Costa de Queiros, Pedro Montoya, Cleber Luz Santos, Marion Alves do Nascimento, Clara Hikari Ito, Manuela Silva, David Barros Nunes Santos, Silvia Benevides e José Garcia Vivas Miranda (2016). “Electroencephalographic patterns in chronic pain: a systematic review of the literature”. *PLoS One* 11, 1–26.
- Sarnthein, Johannes, Jair Stern, Christoph Aufenberg, Valentin Rousson e Daniel Jeanmonod (2005). “Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain”. *Brain* 129, 55–64.
- Siegel, Sidney e N John Castellon (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-hill New York, 75–83.
- Sprent, Peter e Nigel C Smeeton (2000). *Applied nonparametric statistical methods*. Chapman e Hall/CRC.
- Thut, Gregor, Philippe Schyns e Joachim Gross (2011). “Entrainment of perceptually relevant brain oscillations by non-invasive rhythmic stimulation of the human brain”. *Frontiers in Psychology* 2, 170.