



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA**

In Scienze Cardiovascolari

Ciclo XXV

**TITOLO TESI**

**SINTOMI NON MOTORI E DISAUTONOMIA  
CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI SARDI AFFETTI DA  
MALATTIA DI PARKINSON CON E SENZA MUTAZIONI  
DEL GENE LRRK2**

Settori scientifici disciplinari di afferenza

**MED/11**

MED/26

MED/48

Presentata da: Paolo Solla  
Coordinatore Dottorato ..... Prof. Francesco Marrosu  
Tutor/Relatore Prof. Francesco Marrosu

Esame finale anno accademico 2011 – 2012

## **Indice**

Introduzione, pag 3.

La malattia di Parkinson, pag 6.

Epidemiologia, pag 7.

Anatomia patologica, pag 8.

Fisiopatologia, pag 10.

L'eziologia della malattia di Parkinson e il ruolo della genetica, pag 12.

Il gene LRRK2 nella MP, pag 15.

Neuropatologia delle forme genetiche LRRK2-correlate, pag 18.

Caratteristiche cliniche dei pazienti con mutazioni della LRRK2, pag 20.

Mutazioni gene LRRK2 e disfunzione cardiovascolare, pag 22.

Sintomi motori e non motori nella MP. Un apparente dicotomia? pag 23.

I sintomi non motori nella MP, pag 27.

Disturbi disautonomici cardiovascolari nella MP, pag 28.

Sistema nervoso autonomo, pag 30.

Premessa sui test diagnostici cardiovascolari, pag 33.

Heart rate variability (HRV), pag 34.

HRV e malattia di Parkinson, pag 39.

Scopo del lavoro, pag 46.

Materiali e metodi, pag 49.

Analisi genetica per mutazioni gene LRRK2, pag 53.

Metodiche utilizzate, pag 56.

Studio della heart rate variability (HRV), pag 56.

Ecocardiogramma standard, Spekle Tracking e Tissue doppler imaging, Esame Ecocardiografico da sforzo, pag 56.

Risultati, pag 57.

Discussione e Conclusioni, pag 65.

Tavole, tabelle e figure, pag 79.

Bibliografia, pag 94.

## **Introduzione.**

I sintomi di tipo non motorio e, tra questi, i sintomi di disautonomia cardiovascolare, costituiscono un evento comune in pazienti affetti da malattia di Parkinson (MP) in grado di condizionare negativamente la disabilità e la qualità di vita del paziente parkinsoniano [Chaudhuri et al, 2006; Ziemssen et Reichmann, 2010]. I sintomi cardiovascolari possono presentarsi come strettamente correlati alla disfunzione del sistema nervoso autonomo (SNA) o rappresentare, al contempo, un effetto collaterale del trattamento farmacologico sui meccanismi di omeostasi autonoma. La stessa presenza di marcati sintomi e segni disautonomici, ad esordio precoce, che sovrastano il disturbo prettamente motorio, propone diagnosi alternative di disordini del movimento, sul versante dei parkinsonismi atipici, come l'atrofia multisistemica (MSA) [Ziemssen et Reichmann, 2010].

Lo studio dei sintomi di disfunzione autonoma cardiovascolare nella MP è comunemente finalizzato al riconoscimento di quadri d'ipotensione ortostatica, ma resta tuttavia da chiarire, ed esplorare, se altri sintomi di tipo non motorio possano avere una stretta correlazione con le alterazioni disautonomiche.

Inoltre, la classificazione nosologica della MP ha subito, negli ultimi quindici anni, sotto la spinta delle incalzanti scoperte derivanti dagli studi di tipo genetico e della biologia molecolare, una notevole revisione interpretativa. L'identificazione nel 1997 della prima, seppur rara, forma di MP a trasmissione autosomica-dominante causata da mutazioni del gene che codifica per l'alfa-sinucleina [Polymeropoulos et al, 1997] ha modificato il concetto stesso di MP idiopatica. La successiva identificazione di altre particolari forme di MP caratterizzate da specifiche mutazioni genetiche, comprese forme a trasmissione autosomica-recessiva, ha aperto la strada a una nuova e più precisa caratterizzazione fenotipica, con un differente spettro di espressività e differenziazione clinica.

In tale contesto, la scoperta di mutazioni del gene LRRK2 (acronimo di Leucine-rich repeat kinase 2) [Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004], che rappresentano attualmente le

mutazioni genetiche descritte con maggiore frequenza nei pazienti parkinsoniani nelle nostre popolazioni, propone nuovi ed interessanti scenari su una migliore definizione diagnostica sia dei sintomi motori che non motori, con affascinanti prospettive di future terapie geniche volte a migliorare la disabilità e la qualità di vita dei pazienti parkinsoniani. Mentre la tipizzazione dei sintomi motori nei pazienti affetti da mutazioni del gene LRRK2, relativamente più semplici da individuare in una malattia tradizionalmente considerata nell'ambito dei Disordini del movimento, ha evidenziato una buona sovrapponibilità con l'entità motoria classicamente descritta, molti aspetti riguardanti l'insieme dei sintomi di tipo non motorio e, in particolare, quelli disautonomici cardiovascolari rimangono ancora meritevoli di una più attenta esplorazione.

Infine, un ultimo aspetto meritevole di approfondimento verte su quali metodiche possano essere utili nella valutazione della disfunzione autonoma nel paziente parkinsoniano. In tale senso, l'interrogativo cui ci proponiamo di dare una risposta è se un approccio combinato ed innovativo con metodiche di studio della heart rate variability (HRV) associata a valutazione ecocardiografica possa offrire ulteriori informazioni alla valutazione sintomatica ed essere, anche, potenzialmente utile nel monitoraggio dei disturbi disautonomici. Sotto quest'aspetto, la ricerca di metodiche scarsamente invasive e sostenibili dal punto di vista economico per la valutazione ed il monitoraggio dei sintomi cardiovascolari in pazienti affetti da MP rappresenta un importante obiettivo cui dare risposta.

## **La malattia di Parkinson**

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa evolutiva, annoverata tra i disordini del movimento, e rappresenta una delle più frequenti malattie neurologiche dell'età avanzata.

La sua prima comparsa nella letteratura scientifica viene tradizionalmente riportata nell'anno 1817, quando il medico inglese James Parkinson nel suo celebre saggio "An Essay on the Shaking Palsy" descrisse la storia clinica di sei soggetti affetti dalla patologia (da lui nominata appunto "paralisi agitante") che poi sarebbe stata definita con il suo eponimo.

Classicamente, la descrizione clinica della MP è stata focalizzata su quattro sintomi cardinali di tipo motorio quali la bradicinesia, la rigidità, il tremore a riposo e, nelle fasi avanzate, l'instabilità posturale [Hoehn et Yahr,1967], ed i suoi criteri diagnostici clinici sono tuttora basati sulla presenza di questi sintomi motori, insieme a una risposta terapeutica alla terapia dopaminergica e all'assenza di caratteristiche atipiche [Gelb et al., 1999; Hughes et al., 1993].

La base del processo degenerativo sottostante i caratteristici segni e sintomi motori risiede nella perdita dei neuroni dopaminergici mesencefalici a livello della substantia nigra. I meccanismi sottostanti il processo neurodegenerativo rimangono attualmente scarsamente compresi, seppur più fattori, quali stress ossidativo, apoptosi, disfunzioni mitocondriali, neuroinfiammazione e deficit dei meccanismi di degradazione delle proteine, si ritiene possano svolgere un probabile effetto patogenetico, spesso sinergico [Bové et Perier, 2012; Mosley et al, 2006]. In questo complesso scenario, è comprensibile ipotizzare come sia l'interazione di fattori genetici che la presenza di fattori ambientali, possano contribuire allo sviluppo della MP.

## **Epidemiologia**

La MP è attualmente considerata la seconda più comune malattia neurodegenerativa, dopo la malattia di Alzheimer [de Lau et al, 2006], con una prevalenza stimata su valori intorno all'1,8% in soggetti di età superiore ai 65 anni di età [De Rijk et al., 2000]. I valori dei tassi di incidenza standardizzati riportati sono compresi tra 8–18 per 100 000 persone/anno [de Lau et al, 2006]. Sia l'incidenza che la prevalenza aumentano con il progredire dell'età. La prevalenza, quindi con tale incremento età-dipendente, tende così a raggiungere valori superiori al 4% in soggetti di età superiore agli 85 anni [De Lau et al., 2006].

L'esordio clinico della sintomatologia motoria è raramente individuato prima dei 50 anni e presenta un brusco incremento dell'incidenza sopra i 60 anni di età [de Lau et al, 2006].

È comunque possibile identificare casi ad esordio precoce nel 5-10% dei pazienti, i cui sintomi iniziali compaiono tra i 20 ed i 50 anni. Molto più raramente, possono essere individuate forme definite a esordio di tipo giovanile, i cui sintomi compaiono prima dei venti anni.

## **Anatomia Patologica**

La più evidente alterazione osservabile a livello encefalico riguarda la degenerazione delle cellule dopaminergiche nigrali che proiettano dalla pars compacta della substantia nigra, situata nella porzione superiore del mesencefalo, allo striato (nucleo caudato e putamen).

All'esame macroscopico è identificabile un diffuso pallore della substantia nigra, che, allo studio microscopico rivela una quasi totale scomparsa dei corpi neuronali della pars compacta associata ad un quadro di gliosi diffusa reattiva, che mostra una differenza variabile a seconda dei casi esaminati [Jellinger, 1987].

La perdita dei neuroni dopaminergici della substantia nigra con la gliosi reattiva nonché la presenza, nei neuroni integri, d'inclusioni eosinofile citoplasmatiche tipiche, definite corpi di Lewy e costituiti da accumuli di  $\alpha$ -sinucleina ed altri peptidi, costituiscono i marcatori patologici e relativamente specifici della MP, che la differenziano da altri disordini del movimento.

Braak et al [2003], assumendo che l'anomala deposizione di alfa-sinucleina indicasse il processo chiave nello sviluppo della malattia, hanno ipotizzato un sistema di staging della malattia, dimostrando come, in realtà, la degenerazione neuronale della MP inizi a livello del midollo allungato (nucleo motore dorsale del vago e nucleo del nervo glossofaringeo) e dei bulbi olfattivi, diffondendosi solo successivamente al restante tronco encefalico, sino al coinvolgimento più tardivo (nello stadio III di Braak) della pars compacta della substantia nigra. La patologia proseguirebbe poi in senso rostrale giungendo ad interessare la corteccia nelle fasi avanzate corrispondenti al VI stadio.

Secondo questa classificazione, è chiaro come la degenerazione progressiva dei neuroni dopaminergici della parte compacta della sostanza nera si associ alla degenerazione di nuclei aminergici del tronco encefalico (sia catecolaminergici che serotoninergici), del nucleo basale di Meynert (colinergico), dei neuroni ipotalamici, dei bulbi olfattivi e di taluni piccoli neuroni localizzati nella corteccia entorinale e nel giro cingolare. Anche il sistema autonomico

periferico sarebbe interessato con l'evidenza di quadri di degenerazione neuronale nei gangli simpatici e nei neuroni parasimpatici con l'interessamento di fibre afferenti cardiache e del sistema nervoso mioenterico [Iwanaga et al, 1999; Braak et al, 2006].

L'ipotesi di Braak et al [2003] sembra dunque fornire una spiegazione all'evoluzione clinica non solo dei sintomi motori, ma anche della complessità dei vari sintomi non motori osservati nella MP, seppur siano necessari ulteriori approfondimenti [Halliday et al., 2006; Jellinger 2009].

## **Fisiopatologia**

L'alterazione tradizionalmente considerata alla base della fisiopatologia della MP è caratterizzata dalla riduzione dei livelli di dopamina a livello dello striato conseguente alla degenerazione e alla perdita di neuroni dopaminergici della substantia nigra del mesencefalo [Dagher A, 2009].

Il numero di neuroni dopaminergici della substantia nigra varia da specie a specie. Gli esseri umani hanno circa 440.000 neuroni dopaminergici a livello di tale area anatomica [Graybiel et al, 1990]. È un dato acclarato come i sintomi motori compaiano quando il contenuto di dopamina striatale scenda al di sotto di una soglia critica [Hornykiewicz, 1982]. Infatti, solo quando almeno il 50-70% dei neuroni dopaminergici viene perso, i pazienti iniziano a sviluppare i segni e i sintomi motori della malattia.

La via nigrostriatale esplica la sua azione sul controllo del movimento all'interno di un più ampio sistema che comprende non solo i nuclei della base, ma anche altre aree come quelle prefrontali ed il sistema limbico, e dove la dopamina rappresenta il neurotrasmettitore fondamentale [Jenner et al, 2006; Marsden et Olanow, 1998].

In questo complesso intreccio di circuiti, la disfunzione del sistema dopaminergico è alla base della disregolazione di altri sistemi neurotrasmettitoriali, seppur sia sempre più evidente come alterazioni determinatesi in altre aree, anche topograficamente lontane dalla via nigrostriatale, possano essere implicate nella patogenesi della malattia, con alterazione complessiva del quadro sintomatologico [Aosaki et al, 2010].

Infatti, oltre ai neuroni dopaminergici, risultano alterati altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali quello noradrenergico, serotoninergico, colinergico, GABAergico e glutamatergico. L'interessamento di questi differenti sistemi neuronali non solo appare in grado di contribuire all'esordio delle complicanze motorie e non motorie comunemente riscontrate durante la progressione della malattia, ma la loro stessa alterazione precoce potrebbe spiegare alcuni

disturbi, spesso sottovalutati, che secondo le attuali teorie di stadiazione, potrebbero precedere di anni l'esordio motorio della malattia [Braak et al, 2003].

La fase preclinica motoria, secondo tale teoria, avrebbe una durata variabile, e durante tale periodo, la graduale perdita di neuroni dopaminergici si accompagnerebbe a meccanismi di up-regulation, ovvero ad un aumento dell'espressione recettoriale per la dopamina a livello dei nuclei della base [Ferrer et al, 2011], determinando la riduzione del fine controllo esercitato da queste strutture sulle vie motorie sino all'evidenza del quadro della malattia.

Successivamente, con la progressiva degenerazione del sistema dopaminergico nigro-striatale, non solo verrebbe a mancare la produzione della quantità necessaria di dopamina ma sarebbe anche persa la funzione di accumulo della dopamina neoformata dalla levodopa nelle terminazioni dopaminergiche. La perdita di tale funzione determina una disregolazione dell'azione della dopamina sui recettori postsinaptici, con risultato finale della progressiva riduzione della risposta positiva di lunga durata e della risposta negativa di breve durata [Calne et Peppard, 1987]. Tali alterazioni comportano nel tempo la comparsa di complicazioni motorie, quali fluttuazioni motorie e discinesie, che rendono necessari nel tempo frequenti aggiustamenti della stessa terapia [Jankovic et Stacy, 2007].

La degenerazione di strutture centrali e periferiche, non obbligatoriamente dopaminergiche, la cui progressione può non essere contemporanea all'evoluzione del processo degenerativo nigro-striatale, e che tuttora non risulta chiaramente definita [Halliday et al, 2006], rappresenta la principale indiziata dell'ampio insieme dei sintomi non motori di malattia [Chaudhuri et al, 2006; Wolters et al, 2009]

## **L'eziologia della malattia di Parkinson ed il ruolo della genetica.**

L'eziologia della MP rimane allo stato attuale ancora largamente sconosciuta.

La maggior parte dei casi di malattia spesso si presenta in forma sporadica, o apparentemente tale, senza chiara associazione con fattori di rischio specifici. La visione complessiva è che esista una predisposizione genetica individuale, che si combina con l'azione di fattori ambientali.

Tale ipotesi deriva dalla dimostrazione che alcuni agenti esogeni siano in grado di scatenare la malattia. Una prova di quest'assunto deriva dall'identificazione nel 1982 di alcuni casi di parkinsonismo accidentale in soggetti farmacodipendenti che, in seguito all'assunzione di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), un composto secondario che si forma durante la sintesi della meperidina, svilupparono subacutamente un disordine del movimento molto simile alla MP idiopatica [Langston et al, 1983].

Tale scoperta permise di creare un modello sperimentale. Nei primati, infatti l'MPTP produce un parkinsonismo tossico molto simile alla malattia dell'uomo, caratterizzato dalla perdita dei neuroni dopaminergici dovuta all'inibizione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, con conseguente deficit energetico cellulare e aumento della produzione di radicali liberi endogeni. Si ritiene che la causa principale sia rappresentata dal deficit energetico che consegue a tale inibizione; non si esclude però, che alla degenerazione contribuiscano altri fattori, quali un aumento dello stress ossidativo e l'innescò dell'apoptosi.

Studi successivi hanno identificato un insieme di sostanze, simili strutturalmente all'MPTP, contenute in insetticidi ed erbicidi, il cui uso rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di MP, senza tuttavia identificare uno specifico agente eziologico di tipo tossico. Va comunque considerato come una differente suscettibilità genetica possa dare luogo a una maggiore sensibilità all'azione di taluni tossici ambientali e che, viceversa, la stessa interazione con l'ambiente possa influenzare la costituzione genetica.

In ogni caso, è proprio grazie alle scoperte della genetica, compiute durante gli ultimi quindici anni, che si è assistito ad una vertiginosa evoluzione del concetto delle basi eziologiche sottostanti la MP. Questo cambiamento è stato in gran parte determinato dal riconoscimento precoce di forme familiari della malattia, includenti non solo l'identificazione di mutazioni genetiche che causano forme rare di MP o la scoperta di mutazioni più comuni altamente penetranti, ma anche la presenza di varianti genetiche con rischio moderato, sino ad arrivare, più di recente, alla mappatura di multipli loci che conferirebbero un rischio di malattia aumentato, seppur di non elevato impatto [Houlden et Singleton, 2012.]

Sulla base di tali scoperte, la trattazione dell'eziologia della MP è evoluta da un tipico modello di malattia considerato di tipo non ereditario, ad un complesso disturbo, con una componente genetica ben determinata in un considerevole gruppo di pazienti [Klein et Schlossmacher, 2006; Zimprich et al, 2011]. La stessa presenza di fattori di rischio di tipo ambientale [Di Monte, 2003] deve essere quindi necessariamente riconsiderata nell'ambito di un'aumentata suscettibilità genetica a tali noxe [Houlden et Singleton, 2012].

Una classificazione attuale dei loci monogenici associati alla comparsa di MP, con i rispettivi geni e prodotti genici, è riportata nella tabella 1.

Susseguenti all'identificazione del primo gene descritto (SNCA) che codifica per l'alfa-sinucleina [Polymeropoulos et al, 1997], sono stati identificati via via nuovi geni che codificano per la parkina [Kitada et al, 1998], l'oncogene DJ1 [Bonifati et al, 2003], e la PTEN-induced kinase 1 (PINK1) [Valente et al, 2004], sino ad arrivare alla recente individuazione di mutazioni a carico del gene VPS35 [Vilarino-Guell et al, 2011].

Recentemente sono state descritte forme di MP, potenzialmente associate sia a mutazioni del gene EIF4G1 in alcuni casi familiari [Chartier-Harlin et al, 2011] sia mutazioni del gene TARDBP [Quadri et al, 2011]. In realtà, è necessario attendere ampi studi di validazione riguardo a queste ed altre forme presunte di MP associate a mutazioni genetiche, in quanto,

come capitato nel caso di mutazioni del gene TARDBP, mutazioni descritte come sicuramente patogene, non sono state confermate da successivi studi di associazione [Cannas et al, 2013].

Al momento attuale, si stima che circa il 5–10% dei pazienti presenti una forma monogenica di MP individuabili con le attuali tecniche [Lill et al, 2012].

Da punto di vista dei meccanismi di ereditarietà è possibile suddividere la MP, associata a forme di tipo monogenico, in due categorie: quella autosomica dominante e quella autosomica recessiva.

In maniera più specifica, sono state determinate almeno tre forme di MP a trasmissione autosomica dominante: la prima determinata da mutazioni dell'alfa-sinucleina, la seconda riguardante le mutazioni del gene LRRK2, mentre la terza, descritta più recentemente, concerne mutazioni a carico del gene VPS35 [Vilarino-Guell et al, 2011].

Tra le forme a trasmissione autosomica recessiva, le forme più importanti dal punto di vista clinico sono rappresentate principalmente dalle mutazioni dei geni parkina, DJ1 e PINK 1, seppur non vadano dimenticate le mutazioni a carico del gene ATP13A2, che codifica per una ATPasi lisosomiale [Ramirez et al, 2006].

Negli anni a venire, l'impiego di tecniche di sequenziamento di nuova generazione, permetterà verosimilmente la scoperta di ulteriori mutazioni causative di MP. Si ritiene, comunque, che la maggior parte dei pazienti parkinsoniani sia affetta da forme non mendeliane di malattia, che sono quindi causate dall'effetto combinato dei fattori genetici ed ambientali [Lill et al, 2012].

Un concetto che deve essere stressato verte sulla gran mole d'informazioni fornite da tutti questi modelli genetici sui possibili meccanismi patogenetici alla base della MP e, quindi, sulle alterazioni molecolari responsabili della disfunzione neurochimica e, nello stadio finale, della degenerazione neuronale.

## **Il gene LRRK2 nella MP**

La scoperta delle mutazioni del gene LRRK2 ha costituito un importante punto di svolta nel campo dell'eziologia e della genetica della MP.

La storia del gene LRRK2 nella MP inizia nel 2002, con l'identificazione del locus PARK1, identificante una regione pericentromerica sul cromosoma 12 associata alla MP, riportata da Funayama et al [2002]. Gli autori descrissero un'ampia famiglia giapponese (denominata Sagamihara kindred) con una forma di MP ad apparente ereditarietà autosomica dominante e ridotta penetranza. Clinicamente, la malattia ricalcava strettamente una forma abbastanza tipica di MP, con un'età all'esordio nella sesta decade di vita e una buona responsività alla levodopa. In questa prima descrizione, fu segnalato, nell'unico caso studiato, però un particolare aspetto neuropatologico, che, seppur caratterizzato dalla presenza di una degenerazione nigrostriatale, si discostava alquanto dal classico quadro patologico della MP, per la presenza di particolari inclusioni gliali. Tale dato originale, indicativo di una possibile differenza di tipo fenotipico, fu successivamente rivisto con l'analisi anatomopatologica di altri soggetti della Sagamihara kindred che rivelò una grande variabilità e differenza di quadri patologici, includenti sia casi di degenerazione puramente nigrale o casi tipici caratterizzati dalla presenza di corpi di Lewy, ma anche casi di MSA [Hasegawa et al, 2009].

La causa genetica codificata dal gene LRRK2, sottostante il linkage sul cromosoma 12, fu identificata alla fine dell'anno 2004 ed in maniera indipendente da due differenti gruppi [Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004]. I risultati delle due ricerche riportarono insieme un totale di sei differenti mutazioni (R1441G, R1444C, Y1699C, I1122V, I2020T e L1114L). Da un punto di vista costitutivo, il gene LRRK2, è costituito da 51 esoni e codifica per una proteina di 2527 aminoacidi (circa 275-kDa) talvolta chiamata con il nome di dardarina, con un termine derivato dalla parola basca "dardar" che significa tremore. Dal confronto con altre proteine descritte in questa patologia, (ad esempio, l'alfa-sinucleina che è costituita da 140 aminoacidi oppure la proteina DJ1 composta da 189 aminoacidi) la dardarina

appare senza dubbio di dimensioni molto superiori, con il gene che presenta molteplici siti d'inizio trascrizione [West et al, 2005].

L'anno successivo fu descritta un'ulteriore mutazione del gene LRRK2, la G2019S, che attualmente rappresenta quella individuata con maggiore frequenza nella popolazione di origine europea [Di Fonzo et al, 2005; Nichols et al, 2005; Gilks et al, 2005; Hernandez et al, 2005; Kachergus et al, 2005].

Questa particolare mutazione è, infatti, relativamente comune all'interno di diverse popolazioni, ed è stimata come responsabile della MP in circa il 2% dei casi apparentemente sporadici e nel 5% dei casi familiari di MP nelle popolazioni nord-europee e nord-americane, ma può raggiungere frequenze riportate superiori al 10% in pazienti portoghesi, al 20% in pazienti ebrei Ashkenaziti e sino al 40 % nella popolazione berbera nordafricana [Bras et al, 2005; Lesage et al, 2006; Ozelius et al, 2006]. Si ipotizza che tale mutazione sia stata ereditata da un founder comune [Kachergus et al; 2005], in un intervallo compreso tra i 4500 e 9100 anni fa [Bardien et al, 2011].

Nelle popolazioni orientali, come quella cinese di Taiwan o in quella indiana, tale mutazione è alquanto rara, se non addirittura assente [Punia et al, 2006; Lu et al, 2006].

Per ciò che concerne la popolazione italiana, la frequenza della mutazione G2019S su pazienti parkinsoniani è stata riscontrata in uno studio nell'1,9% del campione esaminato, con valori del 1,3% nei pazienti sporadici e nel 4,3% dei pazienti con storia familiare positiva [Marongiu et al, 2006]. La frequenza della mutazione, inoltre, era presente nell'1,2% di pazienti con esordio precoce e nel 4% in pazienti con esordio tardivo. Tali valori sono stati confermati, in seguito, da un altro studio italiano che ha determinato una frequenza pari all'1,7% dei pazienti studiati [Goldwurm et al, 2006].

Mentre un primo studio effettuato in Sardegna, su una casistica molto ridotta di pazienti parkinsoniani sardi, evidenziò un unico paziente con la mutazione G2019S in eterozigosi, con valori di frequenza stimati intorno all'1% [Cossu et al, 2006], uno studio più vasto condotto

su 356 pazienti sardi con MP idiopatica e 208 controlli, ha individuato 8 pazienti con mutazioni in eterozigosi del gene LRRK2 con valori di prevalenza pari al 2.3% (Floris et al, 2009). Per quanto concerne le mutazioni evidenziate, sei pazienti presentavano la mutazione G2019S (1.7%) ed i restanti due la mutazione R1441C (0.6%).

Le mutazioni considerate al momento come sicuramente patogeniche solo le seguenti N1437H, R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, I2012T, G2019S, e la I2020T, anche se deve essere tenuto a mente il concetto della non completa penetranza di queste mutazioni. A tale riguardo, lo studio più esteso finalizzato all'identificazione di questa peculiarità ha dimostrato valori crescenti di penetranza età-correlati della mutazione G2019S che da valori stimati del 28 % all'età di 59 anni salgono al 51 % all'età di 69 anni, sino a raggiungere il 74 % all'età di 79 anni [Healy et al, 2008].

## **Neuropatologia delle forme genetiche LRRK2-correlate**

Dal punto di vista neuropatologico, la maggior parte dei casi finora descritti con mutazioni del gene LRRK2 presentano un insieme di caratteristiche spesso sovrapponibili con la tipica forma della MP ed individuate, dunque, dalla presenza di corpi di Lewy nel tronco cerebrale con la classica perdita di neuroni dopaminergici nella substantia nigra. In tale senso, il gruppo più cospicuo di pazienti esaminati autopticamente [Papapetropoulos et al, 2006] presentava corpi di Lewy, con un pattern assolutamente classico per la MP accompagnata alla perdita di neuroni dopaminergici con gliosi sostituiva, che è ad oggi il comune denominatore del parkinsonismo clinicamente visibile. Tuttavia, sono state descritte caratteristiche patologiche supplementari, talvolta discordanti, con marcato pleomorfismo anatomopatologico [Tan et al, 2006], e contraddistinte dalla presenza di placche e agglomerati neurofibrillari in aggiunta al quadro patologico della MP, o con una degenerazione puramente nigrale senza riscontro di corpi di Lewy, ed anche inclusioni citoplasmatiche gliali che ricordano la MSA [Hasegawa et al, 2009].

A tale riguardo, sono state descritte inclusioni di ubiquitina e alfa-sinucleina, con formazione di corpi di Lewy classici [Whaley et al, 2006], localizzate nella substantia nigra o nelle regioni corticali. In alcuni pazienti, altri autori hanno riportato un quadro tipico di taupatia abbastanza simile a quella della PSP [Rajput et al., 2006], anche se non identica [Gasser, 2006]. Inoltre, sono stati descritti ulteriori casi con solo dato indicativo per taupatia, e altri che non hanno né sinucleinopatia, né taupatia [Galpern et al., 2006].

Zimprich et al. [2004] di fatto avevano già descritto quadri neuropatologici con corpi di Lewy tipici della MP, ma anche quadri più complessi suggestivi per malattia da corpi di Lewy diffusi, degenerazione nigrale senza istopatologia caratteristica, sino ad arrivare a quadri tipici di paralisi sopranucleare progressiva, seppur in pazienti con mutazioni differenti dalla G2019S.

In una famiglia canadese con la mutazione G2019S, sono stati descritti inoltre, casi senza corpi di Lewy ma con evidenza di placche neurofibrillari tau-immunopositive [Rajput et al., 2006]. A questo riguardo, è di recente pubblicazione il caso di un paziente con mutazione G2019S e deposizione della proteina tau con morfologia e distribuzione lesionale molto simile alla tipologia riscontrata in casi di paralisi sopranucleare progressiva [Ruffmann et al, 2012].

Deve essere al contempo chiarito come non vi siano al momento ampie casistiche che abbiano specificamente esaminato tale aspetto [Houlden et Singleton, 2009].

## **Caratteristiche cliniche dei pazienti con mutazioni della LRRK2**

Per quanto concerne lo studio delle caratteristiche cliniche dei pazienti con mutazioni del gene LRRK2, deve essere precisato come la gran parte dei lavori si è soffermata sugli aspetti fenotipici correlati alla mutazione G2019S, ed in particolar modo sui disturbi di tipo motorio. Sotto questo versante, seppur le forme di malattia correlate a mutazioni LRRK2 siano comunemente considerate sovrapponibili a quelle classiche di MP, alcuni isolati pazienti con mutazioni a carico di questo gene sono stati inquadrati in altre forme di disordini di movimento sia da un punto di vista clinico che anatomo-patologico [Ruffmann et al, 2012; Zimprich et al. 2004].

In effetti, alcune delle prime famiglie descritte con mutazioni del gene LRRK2 racchiudevano al loro interno quadri clinici discordanti che potevano giungere ad includere amiotrofia ed importantemente deterioramento cognitivo [Zimprich et al, 2004]. Un'altra importante distinzione rilevata in queste forme verte sulla possibile espressione variabile della severità di malattia, con descrizione di una minore gravità di malattia per rischio di cadute, progressione del deficit e discinesie, seppur vengano descritti al contrario una maggior presenza di quadri distonici e di tremore, che tende spesso a presentarsi come il più frequente sintomo di presentazione [Healy et al, 2008].

In precedenza, uno studio condotto in Norvegia Aasly et al [2005] su nove pazienti con la mutazione G2019S in eterozigosi, aveva evidenziato come le caratteristiche cliniche di questi soggetti corrispondessero ad un parkinsonismo asimmetrico con classico tremore di riposo, bradicinesia e rigidità, con buona risposta alla levodopa, con una sostanziale indistinguibilità del parkinsonismo associato a mutazioni della LRRK2 dalla forma idiopatica di malattia.

In uno studio successivo, Papapetropoulos et al [2006], studiando cinque portatori della stessa mutazione G2019S, rilevò come le caratteristiche cliniche di questi pazienti fossero, in realtà, più eterogenee. Quattro pazienti, infatti, mostravano un'età d'esordio compresa tra i 41 ed i 79 anni. Mentre la maggior parte di questi presentavano caratteristiche cliniche tipiche della MP,

il più anziano esordì con cadute precoci, tremore cinetico ed una scarsa risposta alla terapia con levodopa. Inoltre, era riferita in questo studio la presenza di un portatore di questa mutazione senza alcun sintomo o segno di parkinsonismo: un individuo deceduto all'età di 68 anni per infarto del miocardio.

Le caratteristiche fenotipiche sono state oggetto d'interesse anche nello studio effettuato in Italia [Marongiu et al., 2006] in 21 soggetti con la mutazione G2019S. In questi pazienti l'età d'esordio era compresa in un vasto range tra i 35 ed i 78 anni, con una media di circa 55 anni. Anche in questo studio si confermava il tipico quadro parkinsoniano, con buona risposta alla terapia dopaminergica ed assenza di caratteristiche atipiche. Deve però essere segnalato come circa la metà dei pazienti riferisse la presenza di lievi disturbi neuropsichiatrici, caratterizzati in maniera più marcata da sintomi ansioso-depressivi, con una frequenza superiore alla MP idiopatica. Anche i deficit cognitivi erano riportati con minore frequenza.

I dati di una sovrapposibilità del quadro clinico con la MP derivano, inoltre, dallo studio di un'altra mutazione del gene LRRK2, la Y1699C, riscontrata in una famiglia con parkinsonismo ad esordio tardivo [Khan et al, 2005], che ha fornito ulteriori prove sulla prossimità clinica alla forma idiopatica di MP. In realtà, seppur il fenotipo clinico in questa famiglia includesse un parkinsonismo tremorigeno asimmetrico lentamente progressivo e responsivo alla terapia dopaminergica, la presenza di importanti fenomeni distonici agli arti inferiori rappresentava un dato di sicuro interesse. Anche in questa famiglia si rilevava l'assenza di deterioramento cognitivo, seppur fosse stato osservato qualche disturbo di tipo comportamentale.

Recentemente, un lavoro multicentrico osservazionale condotto in vari Paesi, ha studiato la presenza di mutazioni della G2019S presenti in omozigosi e ha comparato questi dati con quelli riscontrati in pazienti con mutazioni in eterozigosi, nonché con pazienti con forme sporadiche di MP.

Le conclusioni di questo studio riportarono come la MP correlata a mutazioni LRRK2, fosse caratterizzata dalle tipiche caratteristiche cliniche della MP idiopatica, e che l'estrema sovrapponibilità clinica tra pazienti con mutazioni in omo ed eterozigosi non supportasse un effetto di dosaggio genico [Ishihara et al., 2006].

## **Mutazioni gene LRRK2 e disfunzione cardiovascolare**

Al momento attuale, gli studi che hanno ricercato eventuali alterazioni disautonomiche nel parkinsonismo da mutazioni del gene LRRK2 sono alquanto rari. Il primo articolo apparso in letteratura su *Neurology* [Goldstein et al, 2007] riguardava la segnalazione di un singolo caso affetto da MP familiare con mutazione G2019S del gene LRRK2 ed evidenza allo studio PET di marcata riduzione della captazione della 6-[<sup>18</sup>F]fluoro dopamina al livello del tessuto miocardico ventricolare sinistro, consistente con una denervazione cardiaca del simpatico, simile a quella precedentemente descritta in pazienti con forme familiari di MP e anomalie genetiche del gene che codifica per l' $\alpha$ -sinucleina [Goldstein and Kopin, 2001; Singleton et al., 2004.] ed in casi sporadici di malattia [Goldstein et al, 2000]

I pazienti, inoltre, avevano una progressiva caduta della pressione arteriosa durante la manovra di Valsalva e nessun overshoot pressorio dopo il rilascio della manovra, con evidenza d'insufficienza dei baroriflessi simpato-neurale e cardiovagal, con il concetto finale che nella MP con associate mutazioni del gene LRRK2, il parkinsonismo, la denervazione simpatica e l'insufficienza baroflessoria potessero derivare da un unico processo patogenetico. In realtà, tre successivi studi clinici [Quattrone et al, 2008; Ruiz-Martínez et al., 2011, Valldeoriola et al, 2011] hanno messo in crisi questa tesi dogmatica (enunciata per giunta su un unico paziente). Nel primo lavoro, condotto in Italia dal gruppo di Quattrone et al. [2008] è risultato che la scintigrafia miocardica con MIBG era preservata in 3 pazienti non correlati (su 6 studiati) affetti da MP e mutazione G2019S del gene LRRK2. Inoltre, gli ultimi due lavori recentemente pubblicati [Ruiz-Martínez et al, 2011, Valldeoriola et al, 2011] confermano il dato di una minore compromissione alla scintigrafia miocardica con MIBG, rispetto ai pazienti con MP non associata a mutazioni del gene LRRK2, sia nei pazienti con mutazione G2019S che nella cosiddetta variante basca R1441G.

## **Sintomi motori e non motori nella MP. Un apparente dicotomia?**

La MP è stata convenzionalmente inquadrata nell'ambito dei Disordini del Movimento e per molti decenni i campi di ricerca sono stati incentrati principalmente sui sintomi motori e sulle complicazioni ad essi correlati [Marsden et Parkes, 1977; Schrag et Quinn, 2000]. Più recentemente, è stato riconosciuto come la sintomatologia motoria, ed il parkinsonismo in particolare, altro non siano che la punta di un iceberg costituito da molteplici sintomi di tipo non-motorio, spesso lontani dalla semplice definizione motoria e ampiamente sommersi [Langston, 2006]. Tali sintomi non motori condizionano fortemente la disabilità del paziente parkinsoniano e, al contempo, impattano negativamente sulla qualità di vita dei pazienti affetti da tale patologia [Martinez-Martin et al, 2011].

L'esatto valore di prevalenza e la dimensione dell'impatto dei sintomi non motori nella MP costituiscono al momento un dato non completamente definito. Infatti, considerata l'attenzione prestata alle problematiche di tipo motorio, le complicazioni di tipo non motorio hanno spesso ricevuto scarso interesse in letteratura [Chaudhuri et al., 2006; O'Sullivan et al., 2008], mentre i fattori alla base di tali disordini sono ancora largamente sconosciuti e le complesse correlazioni non ancora esaurientemente valutate.

Analiticamente, il complesso dei disturbi non motori della MP [Adler, 2005] si estende dai disordini di tipo neuropsichiatrico (spesso caratterizzati da ansia, depressione, disturbi del controllo degli impulsi e psicosi) [Dissanayaka et al, 2010; Burn DJ, 2002; Weintraub et al, 2010; Henderson et al, 1992] a quelli di tipo cognitivo, sensitivo, del sonno, sino ad arrivare a quelli di tipo autonomico.

Seppur sia stato osservato come alcuni di tali sintomi non-motori rispondano in maniera soddisfacente alla terapia antiparkinsoniana, variando in risposta a vari livelli di stimolazione dopaminergica [Chaudhuri et Schapira, 2009], la maggior parte di questi sintomi sono spesso resistenti alla levodopa, così da ipotizzarne una patofisiologia extrastriatale e di tipo nondopaminergico [Lim et al, 2009]. Si suppone, inoltre, che alcuni di questi disturbi, seppur

intrinseci alla patologia neurodegenerativa, possano essere spesso provocati dalla stessa terapia dopaminergica sostitutiva [Chaudhuri e Schapira, 2009].

Inoltre, molti di questi si sviluppano più tardi nel corso della malattia e contribuiscono notevolmente alla progressiva disabilità resistente al trattamento [Chaudhuri e Schapira, 2009].

Nel corteo dei sintomi di tipo non-motorio spiccano i disturbi autonomici, che rivestono un ruolo singolare nella MP con molteplici espressioni cliniche. Le manifestazioni di tipo autonomico variano da disturbi cardiovascolari, gastrointestinali, urogenitali, termoregolatori, respiratori, alterazioni del sonno o anomalie pupillari [Chaudhuri et al, 2006].

Da tali considerazioni è logico intuire come il processo degenerativo responsabile della MP si sviluppi a più livelli. Non solo non sarebbe spazialmente limitato, con un interessamento limitato alle semplici vie nigro-striatali [Lim et al., 2009], ma avrebbe anche differenti espressioni sul versante di tipo temporale, come indicato dagli studi anatomopatologici di Braak [Braak et al, 2003]. Secondo tale visione prospettica, la malattia avrebbe un'evoluzione anatomica in varie fasi, con un processo neurodegenerativo progressivamente ascendente, che partendo dal nucleo dorsale del glossofaringeo e dal nucleo del vago giungerebbe negli stadi avanzati fino alla mesocorteccia temporale anteromediale e alle aree prefrontali [Braak et al, 2003], con il coinvolgimento dei neuroni simpatici post-gangliari delle colonne intermedio laterali [Bannister et Oppenheimer, 1972; Oppenheimer, 1980].

Pertanto, col progredire della malattia, i disturbi autonomici giungono a costituire un rilievo sempre più frequente se non addirittura costante. Il loro tempestivo ed adeguato riconoscimento risulta, dunque, importante non solo al fine di raggiungere un'accurata diagnosi differenziale tra le varie sindromi parkinsoniane, ma anche per effettuare la migliore scelta terapeutica e formulare la prognosi più attendibile.

Nella pratica clinica, stupisce dover rilevare come, tra i disturbi disautonomici nella MP, i disturbi cardiovascolari, pur rappresentando un evento molto comune ed in grado di causare

una severa condizione di disabilità, siano spesso ampiamente studiati e sottostimati. La presenza di un quadro d'ipotensione ortostatica, ad esempio, può incidere negativamente sulla qualità di vita dei pazienti, spesso con una marcata interferenza sull'attività motoria del soggetto parkinsoniano con un aumentato rischio di cadute e conseguenti fratture traumatiche [Suárez-Moro et al., 2010].

### **I sintomi non motori nella MP.**

I sintomi non motori sono tradizionalmente descritti in stretto rapporto di correlazione con l'avanzare dell'età del paziente e della gravità di malattia, anche se alcuni sintomi non motori, quali i disturbi di tipo olfattivo, la stipsi, la depressione e i disturbi del sonno, possono verificarsi anche nelle prime fasi della malattia, comprese quelle premotorie [Chaudhuri et al., 2005]. Poiché l'età media e la speranza di vita della popolazione sono in continuo aumento, è logico inferire come le caratteristiche non motorie della malattia di Parkinson diventeranno in futuro sempre più importanti. [Chaudhuri et al., 2005; Hely et al., 2005]. I sintomi non motori nella MP sono diversi con un ampio spettro che comprende problemi cognitivi, disturbi neuropsichiatrici, disturbi del sonno, disturbi sensitivi, disfunzioni sessuali, disturbi urinari e gastroenterici, sino ai disturbi disautonomici cardiovascolari.

Un elenco esaustivo dei sintomi di tipo non motorio nella malattia di Parkinson è indicato nella Tavola 2.

## **Disturbi disautonomici cardiovascolari nella MP**

I sintomi disautonomici di tipo cardiovascolare costituiscono un evento comune nella MP, e possono costituire sia una caratteristica clinica associata al parkinsonismo, rilevabile come una disfunzione del sistema nervoso autonomo e correlata al processo neurodegenerativo sottostante, che presentarsi come un effetto collaterale correlato allo stesso trattamento farmacologico, e, quindi, determinato o slatentizzato dagli stessi effetti ed interazioni dei farmaci dopaminergici sul sistema nervoso autonomo.

Da un punto di vista diagnostico-differenziale, la concomitante presenza di un'importante disfunzione autonoma all'esordio del parkinsonismo, che appaia prominente rispetto ai segni motori parkinsoniani e spesso associata ad una mancata risposta terapeutica alla levodopa, è fortemente indicativa per una differente classificazione nosologica sul versante del parkinsonismo atipici, e più specificatamente nell'ambito di una diagnosi di atrofia multisistemica [Gilman et al, 2008].

Tra i sintomi disautonomici cardiovascolari, il sintomo più frequente e descritto è rappresentato dall'ipotensione ortostatica, caratterizzata da un'eccessiva riduzione della pressione arteriosa nel passaggio dalla posizione clinostatica all'ortostatismo. La definizione classica d'ipotensione ortostatica, secondo il consensus dell'EFNS, contempla il rilievo di una caduta della pressione arteriosa sistolica maggiore di 20 mmHg o una diminuzione della pressione arteriosa diastolica di almeno 10 mmHg dopo 3 minuti di ortostatismo o durante l'esecuzione del tilt test ad almeno 60° [Lahrman et al, 2006].

I sintomi che vengono solitamente riferiti in coincidenza di tale fenomeno sono spesso vaghi, seppur generalmente costituiti da debolezza generalizzata, spesso con sensazione di mancamento e lipotimia, confusione e obnubilamento del sensorio. Qualora l'eccessiva riduzione pressoria dovesse persistere nel tempo, essa può determinare un quadro d'ipoperfusione cerebrale più grave che può condurre a un definito episodio sincopale, talvolta associata a convulsioni generalizzate.

In realtà, spesso i sintomi dell'ipotensione ortostatica non appaiono di univoca e facile interpretazione, in quanto talora caratterizzati da disturbi spesso posti in relazione a problemi di altra natura, come ad esempio nel caso dei sintomi da ipoperfusione a carico della muscolatura cervicale, caratterizzati da dolori paracervicali e/o suboccipitali, ed anche rachidei, spesso considerati di competenza ortopedica [Mathias, 2003].

L'evidenza di tale complessa sintomatologia clinica è spesso maggiormente riferita al passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo, soprattutto al risveglio. Fattori associati come calore, cibo, alcool, così come l'esercizio fisico o altre attività che aumentino la pressione intratoracica (ad esempio la defecazione e la tosse), nonché alcuni farmaci (ad esempio vasodilatatori), possono slatentizzare l'espressione di un'ipotensione ortostatica altrimenti asintomatica.

Il disturbo ipotensivo ortostatico è spesso complicato, nelle ore notturne, da un quadro di ipertensione clinostatica. Il ruolo prognostico della disfunzione cardiovagale e dei baroreflessi non è ancora completamente nota [Karemaker et Wesseling, 2008]. Terapie non mediche e mediche possono aiutare il paziente a fronteggiare un'ipotensione ortostatica sintomatica.

Si ritiene che alla base dei disturbi del sistema cardiovascolare di questi pazienti vi sia un'alterazione del sistema simpatico a livello post-gangliare, con evidenza di una disregolazione dei meccanismi di controllo sistemico della pressione arteriosa e di anomalie vasomotorie [Appenzeller et Goss, 1971; Aminoff et Wilcox, 1971]. La perdita di neuroni delle colonne intermedio-laterali del midollo spinale, la disfunzione cardiaca autonoma e la presenza di corpi di Lewy nei plessi vegetativi dei pazienti affetti da MP sono stati individuati come causa principale di tali disturbi [Suárez-Moro et al, 2010]. Inoltre, si suppone che la stessa terapia dopaminergica possa interferire in maniera cospicua su una disregolazione di tale sistema e contribuire alla disautonomia cardiovascolare.

## **Sistema nervoso autonomo**

Il sistema nervoso autonomo regola le varie funzioni del corpo umano, generalmente al di fuori del controllo volontario, al fine di mantenerne l'omeostasi.

L'importanza del sistema nervoso autonomo deriva dal fatto che ogni organo del corpo umano è collegato al sistema nervoso autonomo e regolato di conseguenza da esso. Varie aree del cervello sono considerati centri complessi nell'ambito del cosiddetto network autonomico. Le informazioni ricevute dalla periferia (afferenze autonome) subiscono un processo di elaborazione in tali centri, dai quali viene inviata successivamente una risposta correlata all'organo bersaglio periferico (efferenze autonome). All'interno di questo sistema efferente sono state individuate due vie anatomicamente e funzionalmente distinte, che è possibile differenziare nel sistema nervoso simpatico (definito anche come ortosimpatico) e nel sistema nervoso parasimpatico.

Il sistema nervoso simpatico rappresenta il cosiddetto "sistema di emergenza" e viene usualmente descritto come una componente finalizzata ad una reazione di tipo attacco/fuga (fight or flight). La sua attivazione determina una serie di effetti diretti a tale scopo fra i quali spiccano l'allargamento delle pupille, l'aumento della frequenza cardiaca, nonché l'aumento della forza contrattile cardiaca e della resistenza vasale. Dopo che i nervi simpatici hanno lasciato il midollo spinale, le fibre pregangliari entrano in sinapsi a livello dei gangli paravertebrali e prevertebrali con i corpi cellulari del secondo neurone (postgangliare) da cui partono fibre nervose postgangliari amieliniche che raggiungono gli organi bersaglio. Un'eventuale disfunzione prima di tali gangli riceve la definizione di disfunzione pregangliare, altrimenti viene specificata come postgangliare. In tale sistema, l'acetilcolina costituisce il neurotrasmettitore liberato alle estremità del tratto pregangliare mentre la noradrenalina costituisce il neurotrasmettitore liberato a livello degli organi effettori postgangliari, ad eccezione delle ghiandole sudoripare ove il neurotrasmettitore è ancora l'acetilcolina.

In una visione strettamente dicotomica del sistema nervoso autonomo, il sistema nervoso parasimpatico è comunemente inteso come "l'avversario" del sistema nervoso simpatico, per così dire il "sistema riposo e relax". L'attivazione del sistema parasimpatico controlla tra gli altri la chiusura delle pupille, la diminuzione della frequenza cardiaca e l'attivazione della digestione. Nella regione superiore controlla il sistema autonomo a livello delle ghiandole lacrimali e salivari, del cuore, dei polmoni così come l'apparato digerente superiore. Le fibre nervose esistenti nella zona del coccige sono importanti per il controllo del tratto urinario e del tratto digestivo inferiore. Il principale neurotrasmettitore dei neuroni postgangliari del parasimpatico è l'acetilcolina.

In realtà, il sistema nervoso autonomo non può essere racchiuso in una mera entità dicotomica. Langley ha descritto una terza parte del sistema nervoso autonomo, nota come sistema nervoso enterico, che può essere influenzato sia dal sistema nervoso simpatico che da quello parasimpatico, con una notevole influenza nel regolare la motilità, come pure la secrezione, nel tratto gastrointestinale.

Come accennato in precedenza, al fine di mantenere l'omeostasi interna, il sistema nervoso autonomo funziona come un circuito di controllo che ha bisogno di vari archi riflessi autonomici. Tali archi riflessi consistono di un'afferenza, un'elaborazione centrale e una componente efferente. Il segnale afferente proviene principalmente da sensori specializzati, ad esempio i recettori di pressione, che registrano i cambiamenti nella pressione sanguigna e possono convertire tali variazioni in impulsi nervosi. Il segnale raggiunge il sistema nervoso attraverso i nervi periferici o i nervi cranici. Qui il segnale afferente viene comparato con altri segnali di controllo che vengono elaborati dai centri di regolazione, in specifici centri di elaborazione encefalici. La risposta efferente è generata tali centri nervosi encefalici e viene, dunque, inviata agli attuatori specifici del loop di controllo quali la muscolatura liscia dei vasi sanguigni. La conseguente reazione dell'organo efferente assiste nella correzione delle

condizioni disfunzionali, che sono state registrate dai sensori con l'aiuto di specifici meccanismi di feed-back.

### **Premessa sui test diagnostici cardiovascolari.**

L'obiettivo primario della testistica di laboratorio è diretto ad individuare i segni di insufficienza autonoma, con una valutazione e quantificazione della gravità della malattia. In alcuni casi consente di affinare le possibilità diagnostiche determinando gli eventuali sistemi coinvolti, come ad esempio il deficit del sistema parasimpatico, simpatico o parautonomico, seppur una definitiva differenziazione della localizzazione (centrale, disfunzione pregangliare o postgangliare) non sia spesso chiaramente possibile. I test sono potenzialmente utili, comunque, nel distinguere tra disturbi statici e progressivi, o nel monitorizzare l'eventuale risposta al trattamento, mediante l'utilizzo di misure quantitative nel tempo. È da precisare, comunque, come la combinazione tra caratteristiche cliniche e anomalie rilevate al test sia utilizzata più spesso per stabilire una diagnosi.

Una varietà di condizioni cliniche gioca un ruolo fondamentale nella corretta lettura dei test autonomici nell'ambito dei pazienti affetti da MP.

Le condizioni più comuni includono le neuropatie autonome, quali diabete e amiloidosi sistemica e neuropatie immuno-mediate; le condizioni degenerative; l'insufficienza autonoma pura, ecc. [Weimer et al, 1999].

Al fine di ottenere una buona affidabilità nell'interpretazione dei dati, gli eventuali fattori di confondimento dovrebbero essere minimizzati. In preparazione per il test, i pazienti dovrebbero evitare di assumere sostanze potenzialmente attive sul sistema autonomo, e dunque, se possibile; evitare caffeina, nicotina, pasti abbondanti e esercizio fisico pesante il giorno del test; così come avere recuperato da qualsiasi condizione patologica acuta o da fenomeni di disidratazione. [Weimer, 1999; Hilz et Dutsch, 2006].

## **Heart rate variability (HRV)**

Tra i metodi utilizzati per l'assessment delle funzioni autonome, diversi test sono stati utilizzati per l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV, acronimo di Heart rate variability) con crescente interesse. Infatti, i meccanismi neurali simpatici e parasimpatici che presiedono al controllo del sistema cardiovascolare sono in grado di generare differenti pattern sia sulla frequenza cardiaca che sulla pressione arteriosa [Omboni et al. 1996]. In effetti, la valutazione standard della funzione autonoma cardiovascolare non può esimersi dall'esecuzione di test dedicati ai riflessi cardiovascolari [Ravits, 1997, Myllylä et al. 2000].

L'assessment dell'HRV, in tale contesto è considerato come la misura indiretta più comunemente utilizzata della funzione vagale [Ravits, 1997]). L'HRV rappresenta, infatti, una misura indiretta dell'interazione simpato-vagale a livello del nodo del seno, utilizzata come indicatore del controllo nervoso del cuore.

L'HRV è di semplice registrazione e le misure ottenute sono, quindi, ritenute indicatori sensibili della funzione del sistema parasimpatico. La misurazione dell'HRV può essere valutata, sia su registrazioni elettrocardiografiche di breve durata ottenute in condizioni controllate di laboratorio sia su registrazioni a lungo termine.

Più comunemente, si procede alla registrazione della frequenza cardiaca battiti-battito (beat-to-beat) con la registrazione degli intervalli R-R o dei dati sequenziali della frequenza cardiaca, mentre le risultanti aritmie sinusali sono analizzate con uno dei numerosi metodi disponibili.

Le misure più semplici sono una media del range di cambio della frequenza cardiaca durante la prova oppure un rapporto medio delle differenze d'intervallo R-R (rapporto E:I). Tecniche analitiche più complesse aggiustano parzialmente alcuni fattori di confondimento, come la frequenza cardiaca a riposo e il drift della frequenza cardiaca durante la prova, sulla base di valori normativi descritti per classi di età. [Lowe et al, 1997]. La maggior parte di tali tecniche sono state accettabilmente riprodotte in diversi studi da validazione [Ziegler et al, 1992].

La respirazione ciclica profonda è spesso utilizzata nelle valutazioni di breve durata, in quanto le pathways sia di tipo afferente che efferente sono mediate dal vago e ridotte da agenti anticolinergici. L'effetto è massimo con sei respiri al minuto ma decresce con lo sforzo continuato a causa degli effetti dell'iperventilazione e dell'ipercapnia. Altri test cardiovascolari parasimpatici includono le misure di variabilità della frequenza cardiaca registrate durante il riposo, la tosse, riflesso di immersione (diving reflex), in posizione ortostatica, in posizione accovacciata (squatting) e supina. Tutte queste misure sono modificate da alcuni farmaci o da malattie intrinseche del sistema di conduzione cardiaca [Piha, 1988, 1993, Ewing 1992].

L'analisi dell'HRV è basata sugli standard espressi dal Consensus espresso nel 1996 dalla Task force dell'European Society of Cardiology e della North American Society of Pacing and Electrophysiology . La sua interpretazione è classicamente imperniata su due differenti modalità analitiche: l'analisi nel dominio del tempo (metodiche definite di tipo "time domain") o l'analisi nel dominio della frequenza (metodiche di tipo "Frequency domain), anche se è possibile lavorare con indici di tipo "non lineare." Tale caratterizzazione nasce dal fatto che le variabili interessate possono essere descritte non solo come una funzione del tempo, ma anche come la somma delle componenti oscillatorie elementari, definite dalla loro frequenza e ampiezza. Un numero stabile e sufficiente di dati è richiesto per l'analisi spettrale, specialmente per i metodi di tipo non parametrico, quali la trasformata rapida di Fourier o FFT, acronimo di fast Fourier transform, allo scopo di avere risultati affidabili (Task Force 1996).

Le valutazioni abituali dell'HRV vertono quindi sia sulle misure time domain che di tipo frequency domain. In entrambi i metodi, sono determinati in primis gli intervalli temporali tra ogni normale complesso QRS successivo. In una registrazione elettrocardiografica (ECG) continua viene rilevato ogni complesso QRS e gli intervalli "normal to normal" (NN). Tutti i battiti anormali, non generati dalla depolarizzazione del nodo del seno sono eliminati dall'analisi HRV.

Un concetto che va necessariamente enunciato verte sul fatto che lo studio dell'HRV riflette le fluttuazioni piuttosto che i livelli assoluti del tono autonomico, mentre il ritmo respiratorio è considerato riflettere la modulazione vagale [Hayano et al, 1991].

La finestra temporale dell'analisi HRV può essere sia di breve termine (alcuni minuti) o di più lunga durata (diverse ore), e la realizzazione di ciascuna finestra temporale presenta contemporaneamente dei vantaggi e degli svantaggi. È logico intuire come le registrazioni di più breve termine possano fallire nell'individuare le oscillazioni di ridotta frequenza, mentre quelle di lungo termine possono essere modificate dalle molteplici condizioni ambientali che possono fungere da fattori di confondimento alla lettura dei risultati dell'analisi HRV. Entrambe le metodiche di analisi dell'HRV, sia di tipo time che frequency domain, si sono dimostrate utili nella valutazione degli effetti della disfunzione autonoma in patologie quali diabete, coronaropatie e ictus (Bianchi et al. 1990, Huikuri, 1995, Korpelainen et al, 1996; Korpelainen et al, 1999).

Le misure di tipo "Time domain" sono le più semplici da calcolare ma non forniscono uno strumento idoneo a quantificare l'equilibrio (balance) tra le differenti componenti del sistema nervoso autonomo. Tali misure sono basate o sull'analisi statistica o geometrica della frequenza cardiaca o sugli intervalli tra complessi normali successivi (Task Force 1996). La radice quadrata della varianza o deviazione standard degli intervalli NN (SDNN, acronimo di standard deviation of NN intervals) costituisce la variabile più semplice per il calcolo delle misure "time domain". La SDNN riflette tutte le componenti cicliche responsabili della variabilità durante il periodo di registrazione e dipende dalla durata del periodo di registrazione, che per tale ragione deve essere standardizzato.

Altre misure utilizzate più comunemente usate derivate dalla distribuzione statistica degli intervalli R-R sono la radice quadrata degli scarti quadratici medi tra intervalli RR successivi (RMSSD acronimo di square root of the mean squared differences of successive R-R intervals), la NN50 che identifica il numero delle differenze più ampie di 50 msec di intervalli

RR adiacenti, nonché la sua proporzione (pNN50) [Task Force, 1996]. I metodi geometrici presentano gli intervalli R-R in pattern geometrici ed esistono diversi metodi per derivare misure HRV da questi pattern. Un approccio consiste nell'analisi quantitativa dei plot di Poincaré [Huikuri et al, 1996], che sono dei diagrammi di dispersione che individuano ciascun intervallo R-R come una funzione di precedenti intervalli R-R. La forma del plot può essere classificata in diversi pattern, come nel caso dell'analisi quantitative dei plot di Poincaré [Woo et al, 1994]. Un altro metodo geometrico è l'indice triangolare (triangular index) dove il pattern geometrico è interpolato da una forma definita matematicamente [Malik et al. 1989].

L'analisi frequency domain condotta con l'analisi della densità della potenza spettrale (analisi PSD, acronimo di Power Spectral Density Analysis) rappresenta un'altro strumento importante di ricerca nella valutazione dell'HRV. L'analisi PSD fornisce le informazioni basiche su come la varianza sia distribuita in funzione della frequenza, sebbene solo una stima possa essere ottenuta da opportuni algoritmi matematici (Task Force 1996). I metodi per il calcolo della PSD sono generalmente classificati come non parametrici, come la metodica FFT, prima nominata, e parametrici, come il modello di approccio autoregressivo (AR). I metodi non parametrici hanno il vantaggio di avere più semplici algoritmi ed un'elevata velocità di processazione, mentre i vantaggi dei metodi parametrici sono l'individuazione di componenti spettrali più definite, miglior post-processazione delle informazioni e un'accurata stima della PSD anche con un bassa campionarietà. Gli svantaggi dei metodi parametrici sono rappresentati alla necessità di verificare l'adattabilità del modello scelto. La tecnica matematica dell'analisi PSD consente di individuare 3-4 bande di frequenza delle oscillazioni che sono: una banda ad oscillazione più rapida, detta banda HF (high frequency), con frequenza compresa tra 0,15 e 0,40 Hz, sincrona con l'attività respiratoria (aritmia sinusale respiratoria) e che risulta essere mediata prevalentemente dall'attività efferente vagale; un'oscillazione più lenta, detta banda LF (low frequency), con frequenza compresa tra 0,04 e 0,15 Hz, modulata dal sistema barorecettoriale arterioso e che risulta mediata sia dall'attività

efferente vagale che simpatica; un terzo ritmo, ancora più lento, detto banda VLF (very-low frequency) tra 0,0033 Hz e 0,04 Hz, che riflette l'eventuale presenza di instabilità nel sistema di controllo chimico della ventilazione (respiro periodico di Cheyne-Stokes) o l'attività oscillatoria di altri meccanismi di regolazione non completamente definiti, ed una banda a bassissima frequenza detta ultra low frequency (ULF) con frequenza inferiore a 0.0033 Hz (Task Force 1996). La potenza di ciascuna componente nell'ambito della potenza totale è espresso in unità assolute ( $ms^2$ ). Le componenti LF e HF possono essere espresso anche come unità normalizzate (nu) ed il loro rapporto (LF:HF-ratio) è comunemente usato per esprimere l'indice del bilancio (balance) simpato-vagale. (Task Force 1996).

## **HRV e malattia di Parkinson**

La storia dell'impiego dell'HRV nella malattia di Parkinson muove i primi passi nel 1987 con il primo studio pubblicato dal gruppo finlandese di Myllylä sui riflessi cardiovascolari nella malattia [Turkka et al, 1997]. In questo studio pionieristico, lo studio HRV (inteso come semplice studio delle variazioni R-R), condotto in varie condizioni quali la respirazione profonda, la manovra di Valsalva ed il tilt test, mostrò una differenza significativa tra pazienti parkinsoniani e controlli. La variazione battito-battito (beat-to-beat), infatti, era chiaramente diminuita nei pazienti con MP. La stessa risposta diastolica alla pressione isometrica era anch'essa diminuita. Come corollario, non furono segnalate differenze in nessun indice autonomico tra pazienti trattati e non trattati con levodopa o farmaci anticolinergici. I dati di questo gruppo non furono confermati da uno studio successivo che valutò l'HRV in 67 pazienti con MP idiopatica e 31 soggetti sani di controllo sia in condizioni di riposo che durante la respirazione profonda, la manovra di Valsalva e lo standing [van Dijk et al, 1993].

Successivamente allo studio finlandese, venne pubblicato il lavoro del gruppo italiano di Ferini-Strambi [Ferini-Strambi et al, 1992] che, sempre mediante l'ausilio di una approccio HRV tradizionale, mostrò una disfunzione del controllo autonomico cardiaco durante il sonno, sia di tipo simpatico che, principalmente, di tipo parasimpatico, sebbene i dati ottenuti durante la veglia alla normale testistica di tipo autonomico fossero normali.

Il primo studio pubblicato sull'analisi dell'HRV mediante metodiche di analisi spettrale in pazienti parkinsoniani risale al 1995 ad opera del gruppo francese di Tolosa [Sénard et al, 1995]. Il setting fu costituito su una popolazione di 15 pazienti affetti da MP ed era finalizzato a valutare gli effetti della somministrazione acuta di levodopa sulla pressione arteriosa e sulla HRV in pazienti naive. In questo studio non fu rilevato un effetto significativo della levodopa nel modificare i parametri spettrali, né variazioni significative furono osservate ai parametri spettrali nelle differenti condizioni di clino e ortostatismo.

L'anno successivo fu pubblicato, invece, lo studio di Rodríguez et al, [1997] che rappresenta il primo protocollo ove si proceda alla comparazione tra pazienti sani e controlli. Non solo esso mostrò una riduzione del potere spettrale delle LF e delle HF nel gruppo di controllo di età avanzata e nel gruppo di pazienti parkinsoniani, ma in relazione al gruppo di controllo di età avanzata, i pazienti parkinsoniani mostravano una più bassa frequenza nelle stesse bande, supportando l'ipotesi che sia il controllo simpatico che quello parasimpatico fossero coinvolti. Seppur la metodica di analisi avesse potenzialmente evidenziato una buona affidabilità nel discriminare la presenza di una disfunzione autonoma, occorsero altri tre anni prima che il gruppo italiano di Mastrocola et al [1999] verificasse con una propria casistica il dato ottenuto. I risultati di questo studio, che esaminò una popolazione affetta da MP avanzata con durata media di malattia (circa 10,9 anni) comparata con una popolazione di controlli dichiarata sovrapponibile (seppur non fosse riportata l'età controlli), mostrarono una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi sia per il parametro time domain SDNN che per la banda LF in tutti i periodi esaminati nelle 24 ore. Il parametro HF, al contrario, mostrava una differenza statistica solo nelle ore notturne. A partire da questo lavoro, la frequenza dei lavori sull'HRV si incrementa in maniera progressiva nel tempo. Iniziano, inoltre, a comparire i primi studi sull'effetto dei farmaci antiparkinsoniani sull'HRV, come nel caso del tolcapone, un inibitore delle catecol-O-metil-transferasi, [Meco et al 2000] che non documenta nessuna differenza significativa nei parametri HRV con tolcapone.

Sempre nello stesso anno, il gruppo finlandese di Myllyla [Kallio et al 2000] pubblica il primo di una lunga serie di lavori sull'analisi spettrale HRV in pazienti affetti da MP. In questo studio caso-controllo, vengono inclusi 50 pazienti affetti da MP non trattati farmacologicamente. Seppur lo studio presenti alcune imperfezioni metodologiche, come ad esempio l'inclusione di controlli più giovani di 4 anni e sbilanciati per sesso, l'analisi del potere spettrale dell'HRV rilevava nei pazienti affetti da MP un'insufficienza della regolazione del sistema nervoso autonomo. Infatti, sia i parametri LF, HF ed il rapporto

LF/HF, calcolati con il metodo autoregressivo, che il parametro HF, misurato con la TTF, erano significativamente diminuiti nei pazienti rispetto ai controlli.

Sempre lo stesso gruppo nell'anno successivo [Haapaniemi et al 2001] studiò la HRV mediante una registrazione ECG Holter nelle 24 ore in pazienti non trattati affetti da MP comparati a 47 soggetti di controllo. I risultati dello studio indicarono come tutte le componenti spettrali fossero significativamente diminuite nei pazienti affetti da MP, mentre era presente una correlazione negativa tra la disabilità motoria registrata alla Unified Parkinson's disease rating scale ed i parametri di potenza spettrale VLF and LF. Inoltre, i pazienti con lieve ipocinesia mostravano valori di HF più elevati rispetto a pazienti con più severa ipocinesia, mentre tremore e rigidità non erano associati con nessun parametro HRV.

Ancora lo stesso gruppo nel 2002 [Kallio et al, 2002], dimostrò come la diminuita regolazione autonoma cardiovascolare potesse essere rilevata sia da metodiche di tipo "time domain" che "frequency domain", ma non da metodiche di tipo non lineare o geometriche. Stupisce rilevare, qualche mese dopo, la comparsa di un ulteriore lavoro dello stesso gruppo volto allo studio della variabilità circadiana [Pursiainen et al, 2002] che riconobbe come nei pazienti parkinsoniani insieme alle principali componenti spettrali dell'HRV (LF e HF), anche i valori di deviazione standard dell'analisi ai due vettori direzionali Poincaré, che quantificano la variabilità beat-to-beat a breve termine, fossero sopresse durante la notte.

Il dato della variabilità circadiana è in qualche maniera riverberato nel lavoro più recente di Niwa et al [2011]. In questo studio l'analisi HRV mostrò come le alterazioni parametriche totali rilevate all'HRV così come il rapporto LF/HF siano più basse nei pazienti con MP, ipotizzando ulteriormente come le attività autonome ed i ritmi circadiani del sistema nervoso simpatico possano essere attenuate in questa patologia.

Studi successivi, come quello di Devos et al [2003], si sono incentrati sulla ricerca di possibili correlazioni tra HRV e stadi progressivi di malattia, anche in raffronto a soggetti sani. Essi dimostrarono come, mentre i pazienti in fase iniziale (meno di due anni di evoluzione e senza

levodopa) non mostrassero differenze rispetto ai soggetti di controllo, i pazienti con forma di malattia avanzata mostrassero parametri diurni di LF e del rapporto LF/HF diminuiti. Nel gruppo con la forma avanzata e con sovrapposte complicazioni motorie, inoltre, anche i parametri notturni HF e pNN50 erano diminuiti. Tali parametri erano correlati con la disabilità motoria nel periodo off, suggerendo una diminuzione progressiva dei parametri HRV con la severità della malattia, ma non con la fase di on motorio. Il rilievo di una diminuzione del parametro LF, a dispetto della più elevata attività motoria nel gruppo con discinesie, suggeriva un impairment dei meccanismi di up-regulation cardiovascolare.

Dopo quest'ultimo lavoro, bisognerà attendere altri tre anni, prima di una pubblicazione sull'HRV nella MP. In questa pubblicazione, Mihci et al. [2006] esaminarono principalmente l'associazione tra HRV in ortostatismo e MP idiopatica. A differenza di precedenti studi, essi trovarono come tutti i parametri time-domain fossero più bassi nei parkinsoniani, mentre al contempo segnarono una diminuzione dei parametri LF ed HF all'ortostatismo, senza significative variazioni dei rapporti LF-HF. A differenza di alcuni dei precedenti studi, sia gli indici HRV di tipo time che quelli frequency-domain non mostrarono alcuna correlazione con l'età, la durata e la severità della malattia, nonché con la terapia con levodopa.

All'inizio dell'anno successivo, sempre in tema di HRV ed ipotensione ortostatica nella MP, lo studio di Barbic et al [2007] rilevò come anche con parametri spettrali simili in condizioni basali tra pazienti e controlli, il rapporto LF/HF ed il parametro LF fossero più bassi nei pazienti con ipotensione ortostatica associata rispetto ai controlli. Essi osservarono, inoltre, che in una condizione di tilt test, effettuata nei pazienti affetti da MP senza ipotensione associata, non si verificasse alcun incremento significativo del rapporto LF/HF e delle LF rispetto ai controlli.

Con il maggior uso diagnostico della scintigrafia cardiaca con <sup>123</sup>MIBG, alcuni studi [Haensch et al, 2009] cominciarono a valutare un eventuale associazione tra uptake miocardico del <sup>123</sup>MIBG e balance simpatovagale che però non mostrò alcuna correlazione. Questo dato di

non correlazione con alterazioni rilevabili con diagnostiche cardiache di medicina nucleare, è stato successivamente confermato da Rahman et al, [2011] seppur con metodica PET. Le osservazioni di questo studio documentarono come il parametro LF fosse assolutamente slegato al dato di radioattività miocardica rilevata allo studio dell'uptake con 6-[18F]fluorodopamina. Tale dato sembrerebbe quindi suggerire come il parametro LF possa riflettere la modulazione baroreflessoria piuttosto che il tono cardiaco simpatico.

Altri studi, nel frattempo, si sono indirizzati verso un target di tipo più prettamente di confine con la clinica. Partendo dal concetto che i parametri dell'HRV diminuiscano sia con l'invecchiamento che in associazione alla MP, uno studio pilota condotto da Aerts et al [2009] cercò di dimostrare una correlazione dell'HRV con i disturbi deambulatori o le scale di disabilità motoria senza però riuscirvi.

Molto più interessanti risultano, invece, gli studi sull'uso della metodica HRV nello screening premotorio della MP e di altri disordini del movimento. Tra questi, si distingue lo studio di Valappil et al del 2010, che dall'osservazione di uno sbilanciamento dei parametri rilevati all'HRV come segno precoce di MP, suggerisce un suo possibile uso nello screening premotorio di malattie correlate all'accumulo di corpi di Lewy come, appunto, nel caso della MP.

Altro studio molto interessante comparso nello stesso anno è lo studio di Buob et al [2010] che si propose di investigare il significato funzionale della denervazione cardiovascolare negli stadi precoci della MP, Il dato interessante non è solo rappresentato dal fatto che gli autori su una casistica di sette pazienti rilevino come la componente HF sia significativamente depressa, suggerendo il solo interessamento del parasimpatico nella fase iniziale, ma anche come gli stessi autori tentino di correlare la disfunzione autonoma con uno studio funzionale ecocardiografico con stress farmacologico, anche se purtroppo senza successo.

È da rilevare come in questi ultimi anni, le osservazioni sull'HRV nella MP siano in progressivo aumento. In tale contesto, è interessante sottolineare la numerosità degli studi in

associazione a disturbi del sonno, considerati al pari del disturbo cardiovascolare come un disordine spesso di tipo premotorio.

Nel primo dei lavori mirati allo studio di tale correlazione, Sauvageot et al [2011] hanno dimostrato come la componente LF espressa in unità normalizzate e, in minor misura, il rapporto LF/HF siano ridotti nella MP idiopatica, sia nelle fasi di sonno REM che non-REM, con conseguente ridotta influenza simpatica sull'HRV, in queste fasi, come conseguenza della denervazione postgangliare noradrenergica cardiaca.

Sempre sul campo del sonno, ma in rapporto ai pazienti parkinsoniani con o senza sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS), una recente ricerca su quest'aspetto [Valko et al, 2012] indica come la risposta simpatica all'OSAS sia smorzata nella MP, fornendo un'ulteriore conferma alla denervazione simpatica comunemente osservata in questa malattia degenerativa.

Altri due studi, sempre nell'ambito di laboratori del sonno, [Covassin et al. 2012; Palma et al, 2012] hanno dimostrato quasi in maniera contemporanea come una significativa relazione sia stata individuata tra indici notturni registrati all'HRV e severità della MP. Nel secondo studio [Palma et al, 2012] viene chiaramente indicato come il parametro LF durante il sonno REM potrebbe costituire un markers surrogato di severità di malattia.

Sempre sul versante dell'associazione con premarcatori di malattia ed altri sintomi di malattia, si distingue lo studio di Kang et al [2012] che ha evidenziato come la disfunzione olfattiva possa essere correlata sia con la componente HF all'HRV che con la velocità di costrizione pupillare.

Recentemente, uno studio indiano [Sriranjini et al, 2011], ha riaperto la discussione sull'effetto della levodopa sulla funzione autonoma. Secondo questo studio, oltre ad un incremento dei parametri di tipo "time domain", anche i parametri dell'analisi spettrale compresi LF ed HF, sarebbero aumentati dall'assunzione delle levodopa, almeno nella prima

ora. Tali risultati sarebbero quindi suggestivi di un miglioramento della variabilità complessiva della frequenza cardiaca, indicando un aumentato tono vagale.

Infine, un discreto numero di lavori si è indirizzato negli ultimi due anni alla valutazione dell'effetto della stimolazione cerebrale profonda sull'HRV. Il primo lavoro su questo aspetto [Trachani et al, 2012] seppur non segnalasse un particolare effetto della neurostimolazione sull'HRV, riscontrò comunque una significativa riduzione nella banda LF dopo l'impianto del device.

Sempre su questo tema, Liu et al [2013] hanno mostrato come, all'analisi spettrale HRV, la ratio LF/HF fosse significativamente incrementata dalla stimolazione cerebrale profonda, con una significativa correlazione negativa tra il cambio di potenza del rapporto LF/HF e la posizione dell'elettrodo laterale al punto mediocommissurale. Questi risultati dimostrano come la stimolazione cerebrale profonda del nucleo subtalamico possa interferire sulla regolazione simpatica. In questo caso, la risposta autonoma potrebbe essere dovuta alla distribuzione del segnale elettrico sulle componenti limbiche del nucleo subtalamico o sulle vie simpatiche discendenti nella zona incerta.

Sempre sul versante dell'interazione tra circuiti neurali e sistema autonomo cardiaco si iscrive un recente studio [Liou et al, 2013] che, grazie alle correlazioni con dati HRV ed EEG in pazienti affetti da MP, ha ipotizzato una connettività funzionale tra circuiti premotori-parietali laterali e sistema periferico autonomo.

## **Scopo del lavoro**

Negli ultimi anni, la concezione quasi monolitica di MP come disturbo quasi unicamente motorio si è andata via via disgregando. In tale dinamica di riassetamento interpretativo, molti interrogativi sui sintomi non-motori, ed in particolare su quelli disautonomici cardiovascolari, rimangono ancora senza sufficienti risposte.

Infatti, seppur sia evidente come i sintomi disautonomici cardiovascolari costituiscano un fenomeno comune nei pazienti parkinsoniani, condizionandone negativamente il grado di disabilità globale e la qualità di vita [Chaudhuri et al, 2006; Ziemssen et Reichmann, 2010], resta tuttavia da chiarire ed esplorare se tali alterazioni disautonomiche possano presentare un'evidente attività di correlazione e potenziamento con altri sintomi sia di tipo motorio che non motorio.

Inoltre, l'identificazione di forme monogeniche di malattia, come nel caso delle mutazioni del gene LRRK2, offre la straordinaria possibilità di una più precisa differenziazione fenotipica sia delle caratteristiche di tipo motorio e non-motorio, con i sintomi disautonomici cardiovascolari che rimangono, dunque, meritevoli di ulteriori approfondimenti.

L'enorme mole d'informazioni provenienti dagli studi clinici richiede però una verifica delle ipotesi con l'uso di metodiche di valutazione che siano obiettive e ripetibili.

A tal fine, ci siamo prefissi lo scopo di indagare la presenza dei sintomi cardiovascolari in una vasta popolazione di pazienti affetti da MP, ricercandone non solo la correlazione con gli altri sintomi motori e non motori, ma anche con l'eventuale presenza di forme genetiche di malattia, come nel caso delle mutazioni del gene LRRK2.

Lo scopo principale della prima fase di lavoro è stato quello di valutare tali correlazioni con un assessment mirato alla determinazione di una differente severità dei sintomi non motori, mediante l'utilizzo di una scala specifica, recentemente validata a livello internazionale, su una vasta casistica di pazienti parkinsoniani sardi.

Sulla scorta della presenza di peculiari mutazioni del gene LRRK2 nella nostra popolazione, la seconda fase ed il conseguente obiettivo sono stati volti ad individuare un numero significativo di pazienti affetti da MP associata a mutazioni del gene LRRK2 e confrontare i dati ottenuti alla valutazione non motoria con la restante popolazione di pazienti affetti da MP non correlata a forme monogeniche di malattia.

I dati ottenuti all'assessment sintomatologico, sono stati ulteriormente indagati in una terza fase, più ristretta, concepita in un metodologia di setting di tipo prettamente cardiologico, con l'obiettivo principale volto all'identificazione di eventuali differenze nel balance autonomico e nella dinamica funzionale cardiaca sia nei pazienti affetti da parkinsonismo genetico che nei pazienti parkinsoniani senza evidenza di tali mutazioni. L'obiettivo di tale fase era anche finalizzata alla individuazione di validi e affidabili sistemi di misurazione del disturbo disautonomico cardiovascolare nei pazienti con MP:

Per tale ragione, in questa fase, ci siamo avvalsi di un differente e innovativo approccio di tipo combinato effettuato con l'utilizzo di uno studio della HRV e con successiva valutazione ecocardiografica da stress.

L'identificazione di strumenti affidabili ed economicamente non dispendiosi volti all'assessment obiettivo dei disturbi non motori nella MP, specie quelli di tipo disautonomico, rappresenta uno dei problemi emergenti nella ricerca dei disturbi di tipo non motorio associati ai disordini del movimento.

Infatti, la disponibilità di queste metodiche diagnostiche potrebbe sicuramente influenzare in maniera efficace la gestione della problematica cardiovascolare nella MP, facilitando la prevenzione degli eventi avversi, come ad esempio le cadute susseguenti ad ipotensione ortostatica.

Inoltre, in una prospettiva futura, i medesimi strumenti diagnostici potrebbero costituire uno strumento non invasivo utile al fine di individuare eventuali disturbi disautonomici preesistenti in soggetti con e senza predisposizione genetica alla malattia.

In tale ottica, l'impiego di una siffatta strategia identificativa potrebbe consentire la possibilità di un precoce riconoscimento di specifici indicatori premotori sul versante cardiovascolare, volti a selezionare quindi pazienti più idonei a essere arruolati nei trials clinici per lo sviluppo di nuovi farmaci a finalità "disease modifying".

## **Materiali e metodi**

Nella prima fase dello studio volta a rilevare la presenza dei sintomi disautonomici cardiovascolari e la correlazione con gli altri sintomi non motori di malattia, sono stati inclusi nello studio pazienti consecutivi afferenti all'Ambulatorio per i Disordini del Movimento della Clinica Neurologica dell'Università di Cagliari, residenti in Sardegna, con diagnosi di MP in accordo con i criteri clinici della Parkinson's Disease Society Brain Bank, durante le regolari visite di controllo di follow-up.

I principali criteri di esclusione erano rappresentati dalla presenza di parkinsonismo atipico, dalla storia di pregresso trattamento neurochirurgico per la MP.

Sono stati esclusi, inoltre, i pazienti con evidente deterioramento cognitivo e/o definita diagnosi di demenza, formulata secondo la definizione del DSM IV-TR, con disturbo tale da impedire la corretta comprensione e somministrazione dei questionari. A tal fine, sono stati esclusi pazienti con valore inferiore a 26 al Mini Mental State Examination (MMSE).

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati valutati clinicamente e dal punto di vista anamnestico con raccolta dei dati clinici su una cartella appositamente predisposta, comprendente dati anagrafici quali età, sesso, scolarità, farmaci assunti e dosaggio, valutazione della storia di malattia e di gravità della MP e la sua progressione (valutate attraverso scale universalmente riconosciute quali la Unified Parkinson's Disease Rating Scale [UPDRS] e la scala di Hoehn and Yahr), nonché la presenza e severità delle complicazioni motorie (sia fluttuazioni motorie che discinesie).

La scala UPDRS III è stata usata sia nel suo punteggio globale che come punteggi parziali determinati dalla sommatoria di dati specifici dell'UPDRS. A tal fine, sono stati calcolati i punteggi relativi ai diversi sottotipi motori della MP (tremore, bradicinesia, rigidità, instabilità posturale/andatura). Come precedentemente descritto in altri lavori [Williams et al, 2007] è stata utilizzata la sommatoria dei punteggi attribuiti agli items UPDRS 20 e 21 per il punteggio di tremore, 22 per il punteggio di rigidità, 23, 24, 25, 26 e 31 per il punteggio di

bradicinesia, 27, 28, 29, e 30 (stabilità posturale) per il punteggio di instabilità dell'andatura/posturale.

Il dosaggio complessivo della terapia dopaminergica è stato calcolato mediante il computo del dosaggio giornaliero levodopa equivalente (DGLE) ottenuto per ogni singolo paziente con la seguente formula precedentemente riportata in maniera simile in altri lavori: dose in mg di levodopa + dose levodopa x 1/3 (in mg) se assunta in contemporanea con entacapone o tolcapone, + bromocriptina (mg) x 10 + cabergolina o pramipexolo (mg) x 67 + ropinirolo o rotigotina (mg) x 20 + pergolide (mg) x 100 + apomorfina (mg) x 80 + selegilina (mg) x 10 + rasagilina (mg) x100 [Tomlinson et al, 2010].

La presenza e la severità del corteo di sintomi non motori è stata valutata con la scala specifica Non-Motor Symptoms Scale (NMSS). La NMSS rappresenta la scala di riferimento rivolta alla misurazione sia quantitativa che qualitativa dei sintomi non motori nella MP sperimentati dal paziente durante l'intervallo temporale compreso nei trenta giorni precedenti la valutazione. I 30-items di valutazione di questa scala sono distinti in nove domini fondamentali: cardiovascolare (che comprende 2 items); sonno/fatica (4 items); umore/cognizione (6 items); disturbi percettivi/allucinazioni (3 items); attenzione/memoria (3 items); disturbi del tratto gastrointestinale (3 items); urinari (3 items); sessuali (2 items); e miscellanei (4 items). Il punteggio totale per ogni singolo item è basato sia sul punteggio della severità (da 0 a 3) che su punteggi di frequenza (da 1 a 4) ed è ottenuto moltiplicando questi due score. Il punteggio totale, quindi, riflette sia sintomi severi ma relativamente infrequenti (ad es: i disturbi dispercettivi) che quelli meno severi seppur persistenti (ad es: umore depresso, disturbi urinari o costipazione).

I pazienti sono stati studiati dal punto di vista genetico per l'identificazione di mutazioni della frequenza delle cinque mutazioni più comuni del gene LRRK2 (R1441C, R1441G, R1441H, G2019S e I2020T). I dati dell'assessment globale (motorio e non motorio) dei pazienti

identificati con presenza di mutazioni del gene LRRK2, sono stati dunque comparati con i pazienti MP senza mutazioni del gene LRRK2.

Nella terza fase dello studio, comprendente la valutazione del balance autonomico mediante metodica HRV e valutazione della dinamica cardiaca con Ecocardiogramma standard, Spekle Tracking e Tissue doppler imaging, nonché con esame Ecocardiografico da sforzo, sono stati inclusi sia tutti pazienti appartenenti al gruppo caratterizzato da mutazioni genetiche del gene LRRK2 che un campione di pazienti affetti da MP senza mutazioni del gene LRRK2, adeguatamente bilanciato per età, sesso e terapia farmacologica antiparkinsoniana.

A tal fine, i pazienti sono stati adeguatamente confrontati con un gruppo di soggetti di controllo sani e non assunti alcuna terapia cronica, bilanciati per sesso ed età.

Sono stati esclusi dall'analisi, inoltre, pazienti con gravi patologie renali, polmonari, epatiche o neoplasiche, oppure cause secondarie di disfunzione autonoma diagnosticate sulla base di un'accurata valutazione medico-internistica e di test di routine.

Sono stati esclusi, inoltre, quei pazienti che assumessero farmaci ipertensivi (ed in particolare beta-bloccanti, antiaritmici o ACE-inibitori) in grado di modificare il balance autonomico.

Al fine di non modificare le caratteristiche delle differenti valutazioni, effettuate solitamente nel range di una settimana, la terapia specifica per la MP non è stata modificata nei trenta giorni precedenti l'esecuzione dello studio nonché durante l'esecuzione dello studio.

I soggetti di controllo erano costituiti da soggetti volontari sani senza evidenza clinico-laboratoristica di alcuna malattia organica sulla base di un'accurata valutazione medico-internistica e di test di routine. Inoltre, i soggetti della popolazione di controllo non assumevano alcun farmaco che potesse alterare il profilo autonomico.

Le differenze tra i gruppi studiati sono state valutate attraverso il t test di Student test o dall'analisi ANOVA ad una via seguita dal post-hoc test di Bonferroni, quando appropriati.

Variabili di tipo ordinale sono state confrontate con il Test di Mann-Whitney-U, mentre il test  $\chi$ -quadro o, in alternativa il test esatto di Fisher, sono stati utilizzati per le altre differenze di

gruppo. La correlazione tra i sintomi non motori e le altre variabili è stata condotta mediante due indici di correlazione: la  $r$  di Pearson, altrimenti detta coefficiente di correlazione, generalmente utilizzata per variabili misurate con scale di intervallo o di rapporto e la  $r$  di Spearman, utilizzata nel caso di dati disposti in successioni ordinate. Sono stati inoltre eseguiti due modelli di regressione lineare multipla aventi come variabili dipendenti i due differenti item cardiovascolari della NMSS ed esaminati nell'ambito dei sintomi non-motori. Il limite di significatività è stato impostato se minore di 0,05.

### ***Analisi genetica per mutazioni gene LRRK2***

L'estrazione del DNA da sangue periferico è stata effettuata utilizzando le metodiche standard in tutti i soggetti. Si è quindi proceduto all'amplificazione del frammento di DNA genomico da studiare per le posizioni 2019/2020 tramite polymerase chain reaction (PCR) in una miscela di reazione contenente 50ng di DNA template in 2.5 µl di buffer, 2,5 mmol/L di dNTP, 1,5 µL MgCl<sub>2</sub>, 50 µmol/L per ciascun primer

(Forward: 5'GAGCACAGAATTTTTGATGCTTG3')

(Reverse: 5'TTTTATCCCCATTCCACAGCAGTAC3')

e 1 unità di AmpliTaq Gold, in un volume totale di 25 µl.

Le condizioni di PCR erano le seguenti: 11 minuti a 94° C, 30 cicli di denaturazione di 30 secondi a 94°C, di annealing di 45 secondi a 60 °C, di extension di 1 minuto a 72 °C, con una extension finale di 72° per sette minuti.

Il frammento di DNA genomico da studiare per la posizione R1441 è stato amplificato tramite PCR in una miscela di reazione contenente con 50 ng di DNA template in 2.5 µl di buffer, 2,5 mmol/L di dNTP, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 50µmol/L per ciascun primer.

Le mutazioni G2019S, I2020T, R1441C, R1441G, R1441H, sono state ricercate con la metodica Dot Spot –Ibridazione di sonde marcate, con i seguenti passaggi:

- 1) Frammenti denaturati da PCR spottati sottovuoto su membrana di Nylon (Filtro)
- 2) Filtri preibridati 3 ore/ overnight (saturazione siti membrane)
- 3) Marcatura oligomeri interni con  $\gamma^{32}\text{P}$  al 5'
- 4) Ibridazione filtri + oligoprobe specifici per cambio nucleotidico (1 h -60° C)
- 5) Lavaggio 10 min. a temperatura  $\approx T$  melting specifica
- 6) Esposizione lastra autoradiografia: 1 h.
- 7) Lettura.

Quindi, si è proceduto alla conferma della mutazione G2019S mediante digestione con endonucleasi di restrizione utilizzando l'enzima SfcI come precedentemente descritto [Deng

et al., 2005], con una corsa in elettroforesi su gel di agaroso contenente etidio bromuro. Contemporaneamente, si è proceduto alla conferma delle mutazioni che interessano il codone R1441 mediante digestione con endonucleasi di restrizione utilizzando l'enzima BstUI. Infine, le mutazioni rilevate sono state ulteriormente confermate mediante sequenziamento con il sequenziatore capillare MegaBace 1000, con la metodica Dye ET-Terminator.

## **Metodiche Utilizzate**

### ***Studio dell'HRV***

La valutazione del balance simpatovagale, e quindi del bilanciamento tra funzioni simpatiche e parasimpatiche, è stata compiuta con un approccio di studio della heart rate variability (HRV), tramite l'applicazione di un dispositivo ECG holter. Lo studio HRV rappresenta una metodica non invasiva, ampiamente usata nella clinica come misura delle funzioni autonome cardiovascolari, che riflette appunto il bilanciamento tra il sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico. Le registrazioni ECG Holter sono state eseguite in tutti i soggetti dello studio mediante un recorder digitale a tre canali (Del Mar-Aria recorder; Del Mar Medical, Irvine, CA). Durante le registrazioni 24-h ECG, tutti i pazienti erano liberi di condurre le normali attività della vita quotidiana. Ai pazienti è stato fornito un diario giornaliero ove era richiesto di riportare l'orario di assunzione dei farmaci dopaminergici assunti abitualmente, nonché l'eventuale comparsa di fluttuazioni motorie, indicando, in tal caso, la durata temporale dei periodi di "on" e "off" motorio.

Una volta terminata la registrazione, i dati ECG sono stati scaricati per l'analisi HRV, effettuata mediante il software Impresario Holter Analysis System (Del Mar Reynolds Medical INC, Irvine, CA).

La componente di alta frequenza (high frequency- [HF]) dello spettro di Potenza della HRV, riflettente la regolazione cardiaca parasimpatica (0.15–0.5 Hz), e la componente di bassa frequenza (low frequency [LF]) riflettente la modulazione cardiaca di tipo simpatico (0.04–0.15 Hz) sono state determinate allo scopo di analizzare il loro ruolo contributivo nel determinare le variazioni dell'HRV. Il rapporto LF/HF ratio è stato calcolato ed utilizzato come misura del bilancio tra i due sistemi contrapposti che regolano l'HRV.

Al fine della valutazione complessiva dei dati sono state considerate le variazioni di tali parametri nelle 24 ore. Sono state inoltre computate le variazioni dell'HRV nelle ore diurne (dalle ore 9 alle ore 22) e quelle nelle ore notturne (dalle ore 24 alle ore 06).

*Ecocardiogramma standard, Spekle Tracking e Tissue doppler imaging,*

*Esame Ecocardiografico da sforzo.*

La fase successiva dello studio cardiologico ha previsto l'esecuzione di un ecocardiogramma standard, Spekle Tracking e Tissue doppler imaging, ed un esame Ecocardiografico da sforzo con il letto ergometro, senza uso di sostanze farmacologiche. L'esame è stato eseguito nelle prime ore del mattino, con i pazienti in condizione di buon "on " motorio dopo aver assunto la terapia dopaminergica del mattino.

L'intero esame è stato condotto da un singolo investigatore che non conosceva se il soggetto fosse affetto da MP, né la eventuale presenza di mutazioni del gene LRRK2.

L'esame ecocardiografico standard consisteva di una valutazione ecocardiografica completa mono- e bidimensionale e color Doppler, utilizzando un ecocardiografo Toshiba ARTIDA (Toshiba medical system).

Sono stati misurati i volumi e gli spessori ventricolari ed è stata calcolata la FE utilizzando il metodo di Simpson biplano dalla proiezione apicale quattro camere e due camere. È stato considerato anormale un valore  $<55\%$ . È stata valutata la funzione diastolica, registrando le velocità con il Doppler pulsato nella proiezione quattro camere apicale. Il pattern di flusso mitralico è stato misurato posizionando il volume campione tra i lembi mitralici con il PWD per misurare la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A) e il tempo di decelerazione. L'esame è stato eseguito sulla scorta della traccia elettrocardiografica.

Il tissue doppler (TD) è una metodica ecografica che applica il principio Doppler (sia nella modalità onda pulsata che in quella codice colorato) al fine di misurare le velocità dei tessuti. Basandoci su questa tecnica, abbiamo valutato la funzione longitudinale del ventricolo sinistro misurando le velocità del movimento della valvola mitrale. Il pattern della velocità miocardica è stato misurato posizionando il volume campione nella porzione basale del setto interventricolare. È stato inoltre misurato il picco della velocità sistolica (onda S), il picco

della velocità in protodiastole (onda E), il picco della velocità della contrazione atriale (onda A) e il tempo di rilascio isovolumetrico del ventricolo sinistro (IVRT). Lo studio ecocardiografico è stato condotto acquisendo dati grezzi (raw) utilizzando la metodica Spekle Tracking (ST) per la valutazione di Strain e SR. Strain è l'entità di deformazione della parete miocardica misurata tra due punti della parete stessa. È stato dimostrato che la derivata nel tempo dello Strain, lo Strain Rate (SR), è un indice affidabile non invasivo della contrattilità miocardica. Inoltre, tutti questi parametri sono stati valutati in condizioni basali e sotto sforzo. E stata anche fatta una valutazione ecocardiografica convenzionale e misurata la LVEF attraverso l'utilizzo del metodo biplanare di Simpson in proiezione apicale 4 camere e apicale 2 camere.

Lo studio ecocardiografico da sforzo con il letto ergometro è stato eseguito utilizzando un ciclo ergometro Ergoline con il paziente in posizione semi-supina nel letto ergometro. Il piano di esercizio era ruotato lateralmente a sinistra di 20-30°

Durante lo stress fisico sono stati monitorati continuamente l'elettrocardiogramma e la pressione arteriosa.

Il protocollo utilizzato per l'esercizio fisico è stato un test massimale al cicloergometro secondo il protocollo di Bruce. I criteri per l'interruzione del test erano i seguenti: comparsa d'intenso dolore retrosternale, sottolivellamento del tratto ST, raggiungimento del target massimo di frequenza cardiaca, ipotensione sistolica (riduzione della pressione sistolica >20 mmHg), o ipertensione (incremento della pressione sistolica >220 mm Hg e diastolica >120 mmHg), comparsa di frequenti aritmie ventricolari, intensa dispnea, e altri sintomi che necessitassero l'interruzione dell'esercizio.

Le misurazioni ecocardiografiche sono state acquisite durante gli ultimi minuti di ciascun carico lavorativo. La frequenza cardiaca (mediante traccia ECG) e la pressione arteriosa (mediante sfigmomanometro) sono state registrate al tempo zero e durante gli ultimi 15 secondi di ciascun carico lavorativo.

## **Risultati.**

Sono stati inclusi nello studio 415 pazienti (240 di sesso maschile ed i restanti 175 di sesso femminile) affetti da MP di Parkinson. L'età media all'osservazione era pari a 68,8 anni con deviazione standard (DS) pari a 9,3; mentre la durata media di malattia era pari a  $6,1 \pm 3,9$ . Lo stadio di Hoehn e Yahr medio era pari a  $2,2 \pm 0,7$ , mentre il punteggio rilevato all'UPDRS parte III era pari a  $27,4 \pm 15,0$ . Novantuno pazienti assumevano terapia antipertensiva (22,1%). I dati complessivi di tale popolazione generale con le altre caratteristiche di tipo motorio sono riportati nella Tabella 1.

L'analisi complessiva della frequenza e severità dei sintomi non motori, rilevata alla NMSS (Tabella 2) evidenziava come i sintomi d'ipotensione ortostatica fossero presenti nei primi cinque più frequenti sintomi riferiti dai pazienti, con una frequenza pari al 50,1% dei soggetti esaminati. Tra gli altri sintomi non motori riferiti come particolarmente frequenti dai pazienti spiccavano la nicturia con una frequenza pari al 70,4% della popolazione in esame, la fatica (67,2%), la sonnolenza diurna (54,2%) e i sintomi di depressione (54,2%). La presenza di episodi sincopali era invece riferita in una minore percentuale di pazienti pari al 5,3%.

Nessuno dei due sintomi cardiovascolari presentava in media un elevato score complessivo. Il punteggio medio alla NMSS dei sintomi di ipotensione ortostatica era pari a  $2,5 \pm 3,7$ , mentre era ancora minore per i sintomi di lipotimia pari a  $0,2 \pm 1,5$ .

Lo studio di correlazione tra i due sintomi disautonomici cardiovascolari, rilevati alla NMSS, valutata sia come singoli item sia come dominio complessivo dei sintomi cardiovascolari, con le caratteristiche clinico-motorie nei pazienti parkinsoniani del nostro studio (Tabella 3) non ha evidenziato correlazioni statisticamente significative né con gli anni all'osservazione né con gli anni di malattia. Era rilevabile, invece, una lieve correlazione negativa tra la severità dei disturbi e la stadiazione di malattia effettuata secondo la scala di Hoehn and Yahr ( $r = -0,104$ ;  $p < 0,033$ ), così come una buona significatività statistica, seppur di non elevato rilievo in

termini di coefficiente di correlazione, nella correlazione inversa tra dosaggio dei dopamino agonisti ed episodi sincopali ( $r = -0,130$ ;  $p < 0,008$ ).

La correlazione tra la severità dei due sintomi cardiovascolari con la severità degli altri sintomi non motori (Tabella 4) evidenziava un'elevata significatività per la gran parte di questi sintomi, con l'isolata eccezione dei sintomi dispercettivi e quelli dell'interesse sessuale. In particolare, era evidente una correlazione rilevante sia con altri sintomi di disautonomia sia urinaria (urgenza, incontinenza, nictuira) che gastrointestinale ( $p < 0,001$ ).

Inoltre, era evidente una significativa correlazione con i disturbi dell'olfatto ( $r = 0,175$ ;  $p < 0,001$ ). Più specificamente, la fatica ( $r = 0,341$ ;  $p < 0,001$ ) e la perdita di peso ( $r = 0,371$ ;  $p < 0,001$ ) rappresentavano i sintomi più strettamente correlati ai sintomi d'ipotensione ortostatica ( $r = 0,341$ ;  $p < 0,001$ ), mentre gli stessi sintomi di perdita di peso ( $r = 0,463$ ;  $p < 0,001$ ) insieme ai sintomi di depressione ( $r = 0,363$ ;  $p < 0,001$ ) apparivano quelli più strettamente correlati al gruppo dei sintomi cardiovascolari in toto.

Tale dato veniva confermato dai due modelli di regressione lineare multipla aventi come variabili dipendenti i due differenti item cardiovascolari ed esaminati nell'ambito dei sintomi non-motori. I modelli corrispondenti hanno rappresentato il 26% (ipotensione ortostatica) e il 22,5% (episodi sincopali) della varianza. Nel primo modello di regressione lineare multipla, il riscontro di recente perdita nel peso ( $p < 0,001$ ), di fatica ( $p < 0,001$ ), di stitichezza ( $p < 0,001$ ), di sintomi depressivi ( $p < 0,001$ ), nonché sintomi di urgenza urinaria ( $p < 0,001$ ) sono risultati avere un'influenza significativa sulla severità dei sintomi di ipotensione ortostatica.

Nel secondo modello di regressione, era confermato come il riscontro di recente perdita di peso ( $p < 0,001$ ) insieme alla presenza di costipazione ( $p < 0,001$ ) avessero un'influenza significativa sulla severità dei sintomi lipotimici.

Sono stati riscontrati nella popolazione studiata 10 pazienti portatori di mutazione del gene LRRK2, con frequenza pari al 2,4% della popolazione studiata. Sei pazienti presentavano la mutazione G2019S (14,5%), mentre i restanti quattro la R1414C (0,9%).

Le caratteristiche cliniche motorie e farmacologiche di questa popolazione di pazienti con mutazioni del gene LRRK2, comparate alla popolazione restante di pazienti parkinsoniani senza tali mutazioni, sono riportate nella tabella 5. I dati ottenuti indicano chiaramente come non esistano variazioni significative sul versante fenotipico motorio, rispetto alla popolazione generale, così come sul versante del trattamento farmacologico. In particolare, non si rilevavano differenze rilevanti sul versante delle complicazioni motorie (fluttuazioni motorie e discinesie).

La tabella 6 evidenzia, invece, le differenze qualitative rilevate alla variazione dei sintomi non motori nelle due differenti tipologie di pazienti. I pazienti con mutazioni del gene LRRK2 riferivano una significativa minore severità del carico complessivo dei disturbi non motori rispetto alla popolazione senza tali mutazioni con un punteggio totale alla scala NMSS ( $35,6 \pm 26,2$  vs  $61,1 \pm 45,7$ ). Anche per ciò che concerne i sintomi di disautonomia cardiovascolare, essi erano riferiti con minore severità nella popolazione affetta da parkinsonismo genetico, sia per quanto concerne i sintomi d'ipotensione ortostatica ( $1 \pm 1,4$  versus  $2,6 \pm 3,7$ ;  $p < 0,007$ ) che per gli episodi sincopali ( $0,0 \pm 0,0$  versus  $0,3 \pm 1,5$ ;  $p < 0,001$ ), questi ultimi non riferiti da nessun paziente nel gruppo LRRK2 positivo.

È da rilevare, comunque, come i sintomi disautonomici cardiovascolari non fossero i soli ad essere segnalati con minore severità, ma fosse altresì rilevabile un'elevata significativa statistica anche per altri sintomi non-motori quali l'eccessiva sonnolenza diurna, l'apatia, la depressione, i disturbi dispercettivi allucinatori, la scialorrea, i disturbi della deglutizione, nonché l'alterato interesse sessuale ( $p < 0,001$ ).

Nella fase dello studio comprendente la valutazione del balance simpatovagale mediante metodica HRV e dello studio ecocardiografico sono stati inclusi 8 pazienti appartenenti al gruppo caratterizzato da mutazioni genetiche del gene LRRK2 (4 di sesso femminile e 4 di sesso maschile), 16 pazienti affetti da MP senza mutazioni del gene LRRK2, adeguatamente

bilanciati per età, sesso e terapia farmacologica antiparkinsoniana, così come 8 controlli sani anch'essi bilanciati per sesso ed età.

Le caratteristiche clinico-demografiche di queste due popolazioni di pazienti e dei controlli sani sono indicate nella tabella 7.

Dei dieci pazienti inizialmente identificati ed inclusi nello studio, due pazienti di sesso maschile con mutazione G2019S, sono stati necessariamente esclusi dalle successive valutazioni strumentali per presenza di cardiopatia ischemica cronica e associata presenza di fibrillazione atriale persistente che, come già precedentemente riportato in altri studi, non permette una adeguata lettura e processazione del segnale utile per lo studio HRV. Degli otto pazienti selezionati quattro presentavano la mutazione G2019S e i restanti 4 la mutazione R1441C.

Per ciò che concerne i dati HRV "time domain", nessun parametro analizzato ha evidenziato significative differenze statistiche tra i tre gruppi (Tabella 8).

L'analisi dell'HRV sul versante "frequency domain" ha, invece, permesso di riscontrare un'alterazione del balance simpato-vagale, espresso dalla riduzione del rapporto LF/HF sia nel gruppo dei pazienti nei pazienti con mutazione genetica LRRK2 rispetto ai controlli sani ( $2,24 \pm 0,78$  vs  $2,83 \pm 0,80$ ;  $p < 0,01$ ), che, in maniera più significativa, nel gruppo dei pazienti senza mutazioni genetiche LRRK2 ( $2,23 \pm 0,51$  vs  $2,83 \pm 0,80$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabella 8).

Le due popolazioni di pazienti parkinsoniani con o senza mutazioni del gene LRRK2 differiscono però notevolmente nei restanti parametri HRV esaminati.

Infatti, nel gruppo con mutazione LRRK2, la modificazione sembrerebbe essere correlata ad un aumento assoluto del tono parasimpatico (HF:  $415,0 \pm 216,8$  vs  $189,7 \pm 68,0$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabella 8).

Nel gruppo di pazienti parkinsoniani senza mutazione del gene LRRK2, invece, era presente non solo una differenza significativa nella stessa componente HF con valori nettamente inferiori alla forma genetica (HF:  $157,5 \pm 71,8$  vs  $415,0 \pm 216,8$ ;  $p < 0,001$ ), ma anche una

significativa diminuzione del parametro LF nelle 24 ore sia verso la forma genetica (LF:  $262,2 \pm 57,0$  vs  $486,1 \pm 486,1$ ;  $p < 0,001$ ) che verso i controlli (LF:  $262,2 \pm 57,0$  vs  $348,6 \pm 104,4$ ;  $p < 0,001$ ).

Per ciò che concerne i parametri rilevati nelle sole ore diurne, il parametro HF rilevato nei pazienti con mutazioni LRRK2 rispecchiava la significatività riscontrata durante le 24 ore sia nei confronti dei pazienti non affetti da forma di malattia LRRK2 ( $340,9 \pm 134,4$  vs  $126,1 \pm 51,4$ ;  $p < 0,001$ ), che nei confronti della popolazione di controllo sana ( $340,9 \pm 134,4$  vs  $158,3 \pm 56,3$ ;  $p < 0,0001$ ). Sempre nelle ore diurne, veniva confermata la riduzione del rapporto LF/HF sia nel gruppo dei pazienti con mutazione genetica LRRK2 rispetto ai controlli sani ( $2,54 \pm 0,75$  vs  $3,15 \pm 0,60$ ;  $p < 0,02$ ), che nel gruppo dei pazienti senza mutazioni genetiche LRRK2 ( $2,49 \pm 0,38$  vs  $3,15 \pm 0,60$ ;  $p < 0,001$ ) sempre rispetto ai controlli.

Inoltre, sempre nelle ore diurne, veniva confermata una significativa diminuzione del parametro LF nei soggetti parkinsoniani senza mutazioni genetiche LRRK2 nelle 24 ore sia verso la forma genetica (LF:  $262,2 \pm 42,5$  vs  $412,0 \pm 4183,1$ ;  $p < 0,001$ ) che verso i controlli (LF:  $262,2 \pm 42,5$  vs  $348,6 \pm 104,4$ ;  $p < 0,001$ ).

Nelle ore notturne, sia i due gruppi dei pazienti che il gruppo di controllo presentavano un incremento delle frequenze LF e HF, con una consensuale riduzione del rapporto LF/HF. Durante le ore notturne, mentre il rapporto LF/HF, seppur diminuito nei due gruppi di pazienti parkinsoniani, non mostrava differenze rilevanti dal punto di vista statistico, persisteva l'aumento del parametro HF nel gruppo dei pazienti con mutazione genetica LRRK2 sia verso il gruppo dei pazienti senza mutazione genetica ( $594,9 \pm 280,5$  vs  $233 \pm 56,2$ ;  $p < 0,005$ ), sia rispetto ai controlli sani ( $594,9 \pm 280,5$  vs  $256,8 \pm 32,9$ ;  $p < 0,007$ ).

Lo studio della correlazione tra parametri HRV e severità dei sintomi motori e non motori ha rilevato una correlazione inversa statisticamente significativa tra l'età dei soggetti ed il rapporto LF/HF sia nel gruppo LRRK2 ( $r = -0,789$ ;  $p < 0,03$ ), che nel gruppo di pazienti senza mutazione LRRK2 ( $r = -0,594$ ;  $p < 0,005$ ).

Inoltre i valori dei parametri LF e HF erano in correlazione con il subscore tremore nel solo gruppo dei soggetti con parkinsonismo LRRK2 (rispettivamente  $r_{LF}=0,717;p<0,05$ ;  $r_{HF}=0,829;p<0,01$ ).

Per quanto concerne i sintomi non-motori, era presente una significativa correlazione inversa del rapporto LF/HF sia con la severità del sintomo ipotensione ortostatica registrato alla scala NMSS ( $r=-0,462;p<0,05$ ) che con il dominio complessivo dei sintomi cardiovascolari sempre registrato all'NMSS ( $r=-0,467;p<0,04$ ) nei pazienti affetti da MP non LRRK2 associata (Tabella 9).

Per ciò che concerne lo studio ecografico, i parametri ecocardiografici basali di funzione sistolica non hanno presentato differenze significative tra i tre gruppi, coerentemente con i dati presenti in letteratura che mostrano, almeno nelle fasi di minore compromissione autonoma, la mancanza di alterazioni della performance cardiaca. Tra i parametri di funzione diastolica, invece, abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di controllo e quello LRRK2 negativo rispetto al gruppo LRRK2 positivo solo nel rapporto E/E' ( $11,86 \pm 5,1$  vs  $8,52 \pm 3,19$  vs  $8,4 \pm 1,7$ ;  $p<0,02$ ) (Tabella 10).

Per ciò che concerne i parametri rilevati all'ecocardiografia da sforzo, è da rilevare come tutti i pazienti ed i controlli hanno effettuato una prova massimale (intesa come raggiungimento dell'85% della frequenza massima prevista). Il carico di lavoro al picco è risultato significativamente minore sia nel gruppo dei pazienti affetti da mutazione genetica rispetto a quello dei controlli ( $63 \pm 33$  vs  $103 \pm 40$  Watt;  $p<0,01$ ), che nel gruppo dei pazienti non affetti da mutazione genetica rispetto a quello dei controlli ( $75 \pm 23$  vs  $103 \pm 40$  Watt;  $p<0,01$ ). Le valutazioni effettuate al basale, ai 25 watts ed al picco hanno mostrato in tutti e tre i gruppi un progressivo incremento, statisticamente significativo, dei valori di SR; tuttavia, il Delta misurato al picco (rispetto ai valori basali) è stato significativamente minore sia nel gruppo dei pazienti con mutazione genetica rispetto a quello dei controlli ( $\Delta SR 0,29 \pm 0,16$  Vs  $0,49 \pm 0,16$ ;  $p<0,02$ ) che nei pazienti senza mutazione genetica sempre rispetto ai controlli ( $\Delta SR$

$0,30 \pm 0,18$  Vs  $0,49 \pm 0,16$ ;  $p < 0,04$ ) (figura 1). Tale variazione ha mostrato una correlazione diretta con il rapporto LF/HF nel solo gruppo dei pazienti con parkinsonismo genetico LRRK2 ( $r=0,75$ ;  $p < 0,05$ )(figura 2).

## **Discussione e Conclusioni**

La caratterizzazione dei sintomi non motori, e tra questi, dei sintomi cardiovascolari disautonomici rappresenta un intrigante campo di ricerca nella MP. La consapevolezza dell'estesa variabilità delle manifestazioni non-motorie, che talvolta giungono a dominare il quadro clinico, è stata affiancata dall'ulteriore osservazione clinica ed anatomopatologica di come tali disturbi possano spesso precedere il disturbo motorio, anche di decenni (Braak et al, 2003). Tra i sintomi che si ritiene possano precedere la diagnosi di MP sono stati precedentemente descritti la comparsa di disturbi dell'olfatto, depressione, constipazione, disfunzione cognitiva, disturbi del sonno sino, appunto, ai sintomi cardiovascolari.

In tale ottica, il nostro primo obiettivo è stato volto a identificare in una vasta popolazione omogenea, in quanto proveniente da una ben definita area territoriale, la presenza e le eventuali relazioni tra due dei sintomi cardiovascolari maggiormente riferiti dai pazienti parkinsoniani (ipotensione ortostatica ed episodi sincopali) con gli altri sintomi di tipo non-motorio, nonché con altri parametri di tipo motorio e clinico.

I punti di forza del nostro studio, oltre all'omogenea connotazione territoriale, erano contraddistinti sia dalla selezione di pazienti consecutivi, con una buona rappresentabilità complessiva della popolazione generale che dall'utilizzo della scala NMSS. Tale scala, costruita al fine di permettere la valutazione sia della frequenza che della severità dei sintomi non motori, rappresenta uno strumento ad elevato potere discriminativo, con dati validi e riproducibili [Chaudhuri et al, 2007, Martinez-Martin P, et al, 2009 ].

Le caratteristiche generali della popolazione complessiva, rappresentata da un maggior numero di soggetti di sesso maschile, rispecchiavano largamente i dati rilevati in precedenti ampie casistiche condotti su varie popolazioni [Baldereschi et al, 2000; Bower et al, 1999; Kuopio et al, 1999; Mayeux et al, 1995].

Sul versante dell'analisi complessiva della frequenza e severità dei sintomi non motori, rilevata alla NMSS, il primo dato da sottolineare riguarda la rilevanza, in termini di frequenza,

dei sintomi di tipo cardiovascolare, ed in particolare dei sintomi di ipotensione ortostatica. L'ipotensione ortostatica figura, nella popolazione in esame, tra i primi cinque disturbi di tipo non motorio sperimentati dai pazienti, ed era riferita in almeno un soggetto su due tra quelli esaminati. Tra gli altri quattro sintomi, solo la nicturia e la fatica si distaccavano per importanza clinica, con una presenza in almeno due pazienti su tre, mentre la frequenza della sonnolenza diurna e dei sintomi di depressione era riportata con valori di frequenza sostanzialmente sovrapponibili al disturbo ipotensivo. Tale dato rispecchia in maniera simile i dati recentemente pubblicati in popolazioni omogenee, come nel caso della popolazione belga [Crosiers et al, 2012] ove i problemi ortostatici rappresentano il quinto maggiore disturbo rilevato (41.2 %), dopo i disturbi urinari (59.2 %), la nicturia (56.9 %), l'insonnia (45.8 %), ed i deficit attentivi (45.5 %).

Lo stesso dato di frequenza del disturbo ipotensivo ortostatico appare molto simile ai dati ottenuti da studi multicentrici internazionali ove è stato individuato un valore di frequenza stimato intorno al 40,6% [Martinez-Martin et al, 2011].

Meno rilevante, almeno dal punto di vista numerico, appare invece la comparsa di episodi sincopali riferita in una minore percentuale di pazienti (5,3%). Tale dato, seppur inferiore al valore di frequenza dei pazienti (9,2%) riscontrato in un vasto studio multicentrico con la medesima scala [Martinez-Martin et al, 2001], appare di notevole importanza clinica in quanto gli episodi di perdita di coscienza con cadute costituiscono un serio fattore di rischio specie per traumi e fratture [Kerr et al, 2010].

È interessante dover rilevare come lo studio di correlazione non abbia evidenziato correlazioni significative né con gli anni all'osservazione né con gli anni di malattia. In realtà, l'ipotesi dell'indipendenza della disautonomia cardiovascolare dal deficit dopaminergico striatale può considerarsi come un concetto sufficientemente accertato [Goldstein et al, 2008]. In altri termini, la disfunzione autonoma, almeno come riflesso da denervazione simpatica noradrenergica, sembra verificarsi indipendentemente dalla lesione dopaminergica che

produce il disturbo clinico motorio nella MP, spesso con esordio anche precedente di anni lo stesso disturbo motorio [Jain et Goldstein, 2012]

Sempre tenendo a mente tale concetto, non suona sorprendente l'osservazione di una correlazione negativa, seppur di lieve entità, tra la severità dei disturbi e la stadiazione di malattia secondo Hoehn and Yahr. Tale dato, solo apparentemente paradossale, rappresenta un dato ulteriore a riprova del fatto che l'esordio di tali disturbi spesso avvenga già nelle prime fasi di malattia, magari slatentizzata dall'inserimento dei farmaci dopaminergici, o, addirittura nelle fasi precliche del disturbo motorio [Goldstein 2006; Goldstein, 2007]. Inoltre, appare probabile che negli stadi più avanzati (con il paziente portatore di un severo grado di disabilità e confinato in sedia, o ancora peggio, nel letto) tale categoria di sintomi, pur presenti, potrebbe essere osservata o sperimentata dal paziente con minore severità.

Inoltre, il riscontro di un'elevata significatività statistica nella correlazione inversa, seppur di non elevato rilievo in termini di forza, tra dosaggio dei dopamino agonisti e sintomi sincopali appare anch'esso carico di interesse. Tale dato è quasi sicuramente imputabile al fatto che i dopamino agonisti rappresentano spesso il farmaco di primo impiego nella MP all'esordio e che nelle fasi d'incremento possano talvolta determinare, in pazienti naive da trattamento farmacologico antiparkinsoniano, l'insorgenza di un effetto collaterale ipotensivo [van Dijk et al, 1993]. La diminuzione del dosaggio del dopamino agonista sarebbe, dunque, un riflesso della comparsa della sintomatologia disautonomica e non la causa della comparsa di tali sintomi.

Di estremo interesse appare, inoltre, il riscontro di una forte correlazione tra la severità dei due sintomi cardiovascolari con la presenza degli altri sintomi non motori, con l'isolata eccezione dei sintomi dispercettivi e quelli dell'interesse sessuale.

In particolare, era evidente una significativa correlazione con gli altri sintomi disautonomici sia urinari (urgenza, incontinenza, nicturia) che gastrointestinali. Sotto questo versante, appare logico ipotizzare come il disturbo disautonomico cardiovascolare sia da inserire in un più

complesso deficit disautonomico globale, che arriva ad interessare multipli distretti corporei [Jain, 2011].

Anche la significativa correlazione con i disturbi dell'olfatto non appare un dato eccessivamente sorprendente.

In effetti, precedenti studi hanno mirato allo studio di una correlazione tra disautonomia cardiaca e disturbi olfattori, determinando come il deficit olfattivo fosse correlato sia alla disfunzione cardiaca simpatica che a quella parasimpatica [Oka et al, 2010]. Tale correlazione è stata riscontrata anche nell'ambito di un inquadramento di tali disfunzioni all'interno del capitolo dei possibili marker preclinici. I risultati ottenuti hanno suggerito come la degenerazione simpatica possa evolvere in parallelo con il disturbo olfattivo nei pazienti con fase iniziale di malattia, mentre nelle fasi avanzate di malattia i due differenti sistemi spesso tendano a degenerare con velocità differenti [Iijima et al, 2010]. In tale disamina, è doveroso ricordare anche un recente studio che ha rilevato come il coinvolgimento dell'impairment olfattorio si accompagni frequentemente alla disautonomia parasimpatica cardiovascolare [Kang et al, 2012]. Tale studio, oltre a valutare la correlazione tra HRV ed altri parametri clinici, rappresenta uno dei primi tentativi di studio globale, o in altri termini di tipo olistico, concepito con lo scopo di individuare le complesse e multiple interazioni presenti tra le molteplici caratteristiche di tipo non motorio. Pur con una scarsa popolazione (appena 33 pazienti), le osservazioni sembrano supportare la nozione che sia l'invecchiamento che la MP possano agire comunemente con ampio effetto sinergico sul coinvolgimento di discrete componenti del sistema autonomo e olfattivo [Kang et al, 2012]

Riguardo ai sintomi d'ipotensione ortostatica, sia la fatica che la perdita di peso apparivano quelli con il coefficiente di correlazione più elevato, come ulteriormente confermato dal modello di regressione lineare multipla.

Seppur la correlazione con la fatica rappresenti un dato estremamente interessante, è doveroso rilevare come siano presenti in letteratura alcuni dati preliminari [Nakamura et al, 2011] che

individuano come la disfunzione autonoma cardiovascolare simpatica possa essere strettamente associata al sintomo fatica in pazienti affetti da MP.

Al contrario, l'interpretazione univoca del significato della correlazione rilevata tra perdita di peso e disautonomia cardiovascolare appare di più complicata soluzione.

A tale riguardo, una possibile spiegazione verterebbe sul fatto che la perdita di peso non rappresenti altro che un "epifenomeno" del disturbo disautonomico. Infatti, la sintomatologia alla base dell'ipotensione ortostica, spesso associata a malessere con nausea ed emesi, potrebbe essa stessa costituire la causa di una ridotta alimentazione con conseguente perdita di peso.

Al momento attuale, il nostro studio rappresenta la prima valutazione di tipo olistico nel contesto dei sintomi non motori condotta in una vasta popolazione omogenea con una scala mirata sia al riconoscimento che alla valutazione della severità dei sintomi non-motori studiandone più miratamente la correlazione con i disturbi di tipo disautonomico.

È comunque, doveroso citare un precedente studio con approccio multisintomatico non-motorio condotto nei Paesi Bassi che ha coinvolto un numero di pazienti sovrapponibile al nostro (420 pazienti) mediante l'utilizzo della scala SCOPA-AUT ed altre scale di valutazione [Verbaan et al, 2007]. Questo studio ha rilevato una discreta correlazione tra sintomi autonomici confrontati con altri sintomi non motori, quali sintomi depressivi, complicazioni psichiatriche, funzioni motorie, sonnolenza diurna e disturbi del sonno, nonché di tipo inverso con i sintomi di tipo cognitivo.

Differentemente dai nostri dati così come nei precedenti report, i sintomi cardiovascolari nello studio di Verbaan et al [2007] comparati con altri sintomi autonomici erano quelli meno frequenti. Come dichiarato dagli stessi autori, le osservazioni rilevate non potevano comunque essere generalizzate alla popolazione generale affetta da MP, in quanto i criteri di selezione di questo studio di tipo prospettico, prevedevano l'arruolamento preferenziale di pazienti di

giovane età e quindi anche con maggior uso di particolari tipologie di farmaci come i dopamino agonisti [Verbaan et al. 2007].

Il nostro studio non si è però limitato ad osservare la popolazione nel suo insieme, ma sulla scorta di un precedente lavoro del nostro gruppo di ricerca sulla presenza di mutazioni genetiche del gene LRRK2 nella popolazione sarda [Floris et al, 2007], si è prefisso l'obiettivo di definire le caratteristiche fenotipiche sul versante non motorio, ed in particolar modo, di tipo disautonomico, su questa peculiare tipologia di parkinsonismo genetico.

Al momento attuale, infatti, sono stati pubblicati i dati di uno studio multicentrico mondiale ove sono stati studiati 179 pazienti affetti dalla mutazione G2019S [Healy et al, 2008]. Seppur tra gli scopi dello studio, oltre ai sintomi motori, fosse previsto anche una valutazione dei sintomi non-motori, per problemi di tipo metodologico, dovuti proprio al gran numero di pazienti e di centri coinvolti a livello mondiale, fu possibile utilizzare solo tre scale validate: il test UPSIT per l'olfatto, il MMSE per il disturbo cognitivo e la scala di Hoehn and Yahr scale per la disabilità motoria. Sulla base degli scarsi dati informativi offerti da queste tre scale, è intuitivo immaginare come fosse difficile, definire una chiara definizione fenotipica sia per i sintomi motori che per quelli non motori.

Pur con questi distinguo, un'osservazione desunta da tale studio fu l'impressione che le forme di MP associate a mutazioni LRRK2 presentassero una forma più benigna di quelle mostrate dalla popolazione parkinsoniana di controllo, con, ad esempio, un minor rischio di deterioramento cognitivo [Healy et al, 2008].

In realtà, tali osservazioni rimangono incerte [Marras et al, 2011], mentre altri studi condotti spesso sulla scorta di dati clinici di pazienti affetti da PD e studiati nelle brain bank, potrebbero non riflettere in maniera precisa la popolazione reale.

La presenza di mutazioni nella popolazione sarda sia di mutazioni G2019S che R1441C del gene LRRK2 conferma per molti versi quanto precedentemente rilevato nel nostro precedente report [Floris et al, 2007], seppur venga rilevato un numero percentualmente maggiore di

pazienti affetti da mutazioni R1441C rispetto al precedente studio. Tale osservazione, che mostra un'importante rappresentazione della mutazione R1441C nella popolazione sarda, avvicina il nostro dato a quello osservato nell'Italia meridionale [Criscuolo et al, 2011].

Dal punto di vista descrittivo, mentre l'esame delle caratteristiche di questa popolazione di pazienti con mutazioni del gene LRRK2, comparate alla popolazione restante di pazienti parkinsoniani senza tali mutazioni, non evidenziava variazioni significative nè sul versante fenotipico motorio nè su quello del trattamento farmacologico, si rilevavano interessanti differenze qualitative riguardo all'assessment dei sintomi di tipo non motorio.

I pazienti con mutazioni del gene LRRK2, infatti, riferivano una significativa minore severità del carico complessivo dei disturbi non motori rispetto alla popolazione senza tali mutazioni con un punteggio totale alla scala NMSS significativamente inferiore. Tale sorprendente risultato si rifletteva anche nei dati di severità dei sintomi di disautonomia cardiovascolare, anch'essi riferiti con minore severità nella popolazione affetta da parkinsonismo genetico.

Precedenti dati di letteratura sembrano supportare tale osservazione di differenti caratteristiche fenotipiche di tipo non-motorio sul versante cardiovascolare. Una prima conferma deriva dallo studio italiano di Quattrone et al [2007] che alla scintigrafia cardiaca con <sup>123</sup>MIBG identificò un quadro di anomalo uptake in soli tre dei sei pazienti con mutazione G2019S nel gene LRRK2, mentre questo era anormale in tutti i pazienti affetti da MP idiopatica. Un'ulteriore conferma deriva dai dati scintigrafici del gruppo di Barcellona che hanno evidenziato come l'uptake cardiaco della <sup>123</sup>MIBG in 14 pazienti affetti dalle mutazioni G2019S/R1441G fosse significativamente meno compromesso se raffrontato a pazienti con MP senza tali mutazioni [Valledeoriola et al, 2011]

È da rilevare, comunque, come nella nostra popolazione i sintomi cardiovascolari non fossero i soli ad essere segnalati con minore severità, ma fosse altresì rilevabile un'elevata significativa statistica anche per altri sintomi quali l'eccessiva sonnolenza diurna, l'apatia, la

depressione, i disturbi dispercettivi allucinatori, la scialorrea, i disturbi della deglutizione, nonché l'alterato interesse sessuale ( $p < 0,001$ ).

In questo senso, i nostri dati sembrerebbero confermare le supposizioni espresse nello studio multicentrico di Healy et al. [2008] documentando come le forme di parkinsonismo correlate a mutazioni LRRK2 possano esprimere una forma più benigna di MP.

Il messaggio più interessante riferito a tali forme, è rappresentato dal fatto che tale benignità non sarebbe condizionata dalle caratteristiche di tipo motorio (complicanze comprese), largamente sovrapponibili a quelle della forma non genetica, ma dalla minore espressività clinica delle manifestazioni non motorie, con un ipotizzabile minore impatto negativo sulla qualità di vita.

È logico intuire, come a questo punto, lo step da superare sia stato il passaggio dalla visione puramente sintomatica a quella obiettiva mediante l'utilizzo di particolari strumenti di valutazione, come proposto dalla terza fase del progetto.

Sotto questo aspetto, è doveroso ricordare come spesso non sia obiettivamente nessuna correlazione tra la severità dei sintomi autonomici e le anomalie rilevabili ai test elettrofisiologici [Papapetropoulos et al, 2006].

Ciononostante, ci siamo prefissi di valutare il disturbo disautonomico cardiovascolare in una popolazione di pazienti affetti da MP, con presenza o assenza di mutazioni del gene LRRK2 (G2019S e R1441C), attraverso l'utilizzo di un approccio innovativo combinato basato su uno studio della HRV e con valutazione ecocardiografica da stress. Infatti, sebbene negli ultimi anni l'interesse per le forme di parkinsonismo genetico e per i disturbi non motori correlati alla MP appaia di crescente interesse, gli studi diretti ad indagare obiettivamente possibili alterazioni associate del sistema cardiovascolare ed eventuali differenze associate a forme genetiche sono alquanto rari.

Da un punto di vista generale, nell'ambito della popolazione affetta da MP idiopatica, le precedenti ricerche hanno determinato come l'ampiezza delle variazioni registrate all'HRV sia

sostanzialmente diminuita nei pazienti con MP, comparata con una popolazione di controlli senza malattia (Devos et al, 2003; Haapaniemi et al., 2001; Pursiainen et al., 2002).

Il nostro studio costituisce, però, una novità assoluta nell'utilizzo di tale metodica in popolazioni con MP genetica associata a mutazioni LRRK2 e comparate con un gruppo di controllo composto da pazienti parkinsoniani senza tale mutazione, nonché con una popolazione di controllo sana. Il dato fondamentale che scaturisce dal nostro studio HRV è la chiara distinzione tra queste differenti popolazioni di soggetti, con una netta differenziazione tra i due gruppi di pazienti parkinsoniani.

Infatti, mentre emerge netto, in entrambi i gruppi, il riscontro di un chiaro sbilanciamento dell'equilibrio simpatovagale nella modulazione autonoma cardiovascolare così come determinato dal rapporto LF/HF, tale alterato balance non riconosce un'univoca interpretazione nei due gruppi di pazienti.

I dati ricavati nei pazienti con MP senza mutazione genetica, con una riduzione del rapporto LF/HF e una consensuale riduzione dei parametri HF ed LF, quest'ultima statisticamente significativa, rispecchiano, infatti, i dati presenti in letteratura. Diversamente da questi, invece, per ciò che concerne il gruppo dei pazienti con mutazioni del gene LRRK2, l'alterato balance sembrerebbe trovare una spiegazione nell'aumento significativo della componente HF (mediata principalmente dal sistema parasimpatico), che sarebbe, dunque, indice di una eccessiva attivazione del sistema vagale.

Il dato di un aumento della componente HF rilevata nei pazienti affetti da parkinsonismo genetico sia rispetto alla forma di malattia idiopatica che rispetto ad una popolazione di controllo rappresenta un dato inusuale. Infatti, se l'alterazione del balance a favore del sistema parasimpatico è supportata da evidenze istologiche di un marcato coinvolgimento dei neuroni simpatici postgangliari a livello cardiaco nei pazienti con MP idiopatica (Iwanaga et al, 1999), l'osservazione di un'eccessiva attivazione del sistema vagale nei pazienti con mutazioni LRRK2 indica come tale dato non dovrebbe essere considerato come assoluto per le forme

genetiche di MP. A riprova di questa ipotesi, infatti, è da rilevare come precedenti studi, condotti in soggetti con MP e mutazione del gene parkina (un altro importante parkinsonismo monogenico a trasmissione recessiva) che hanno valutato i riflessi autonomici cardiovascolari, abbiano evidenziato un pattern estremamente diverso rispetto a quello rilevato nella MP verosimilmente idiopatica, non registrando alcuna differenza tra i pazienti e la popolazione di controllo nella valutazione quantitativa e qualitativa delle funzioni simpatiche e parasimpatiche (Del Sorbo et al, 2004).

È doveroso inoltre rimarcare come pochi articoli abbiano rivolto il loro interesse su mutazioni del gene LRRK2 e disturbi cardiovascolari. Il primo articolo apparso in letteratura [Goldstein et al, 2007] riguardava la segnalazione di un singolo caso affetto da MP familiare con mutazione G2019S. Le osservazioni su questo singolo paziente conducevano all'assunto finale che in tale forma genetica sia il parkinsonismo che la denervazione simpatica, con l'insufficienza baroflessoria associata, potessero risultare da un unico processo patogenetico sovrapponibile alla forma idiopatica.

Tre successivi studi clinici hanno posto in revisione questo concetto quasi dogmatico [Quattrone et al, 2008; Ruiz-Martínez et al., 2011, Valdeoriola et al, 2011] derivata dallo studio di un unico paziente, rilevando un'importante differenza nel grado di compromissione miocardica associata a mutazioni del gene LRRK2 (evidenziata alla scintigrafia con MIBG) rispetto ai pazienti con MP idiopatica, con una minore entità del disturbo.

In ogni caso, un limite di questi ultimi tre studi verte sull'eccessiva limitazione delle osservazioni al mero dato anatomofunzionale di disfunzione simpatica, tralasciando di valutare in maniera più globale l'assessment complessivo del balance simpatovagale. È chiaro che una tale lettura dei dati, seppur molto interessante, appare complessivamente incompleta perché, come ben evidenziato dagli studi di Braak et al [2003], la progressione del danno in senso caudo rostrale tende ad interessare anche i nuclei troncali, deputati al controllo delle

fferenze del parasimpatico, con la possibilità di una alterazione dei meccanismi di controllo di tipo centrale e, quindi, non unicamente di tipo periferico.

A livello speculativo, è possibile ipotizzare che la perdita di una pathway di tipo inibitorio potrebbe essere alla base dell'eccessiva stimolazione del parasimpatico in questa forma genetica. D'altronde, come derivato dai recentissimi studi di HRV in pazienti portatori di impianti di stimolazione cerebrale profonda, emerge in maniera evidente come l'inibizione di aree anatomiche, probabilmente prossime al nucleo subtalamico, possa in qualche maniera interferire sul circuito autonomico con variazioni dei parametri all'analisi spettrale [Trachani et al, 2012; Liu et al, 2013].

In alternativa, anche tenendo conto del dato ottenuto dallo studio clinico di una relativa minor severità dei sintomi cardiovascolari nei pazienti con mutazioni del gene LRRK2, e ricordando i dati dello studio di Buop et al [2010] che rilevavano come la disfunzione autonoma nella fase iniziale di malattia fosse causata dal solo interessamento del parasimpatico, non pare inverosimile pensare ad una iniziale fase di tipo compensatorio, in cui la disregolazione potrebbe generare, almeno inizialmente, risposte di inversa portata.

Un altro dato interessante del nostro studio verte sulla conferma del ritmo circadiano dell'HRV nelle tre classi di soggetti. Differentemente, però, da altri studi che indicavano come le alterazioni HRV tendessero ad essere più evidenti nelle ore notturne nei pazienti con MP [Mastrocola et al, 1999; Pursiainen et al., 2002], il nostro studio non ha mostrato una significativa differenza statistica dei parametri HRV nelle ore notturne nei pazienti affetti da MP rispetto ai controlli.

Altro dato interessante che dimostra l'utilità delle metodiche HRV abbinate alla clinica è rappresentata dalla correlazione tra i parametri dell'analisi di tipo "frequency domain" con caratteristiche cliniche. Oltre all'interessante correlazione tra i parametri LF e HF ed il subscore tremore nel solo gruppo dei soggetti con parkinsonismo LRRK2, la rilevazione nei pazienti affetti da MP senza mutazioni LRRK2 di una correlazione significativa tra il rapporto

LF/HF con la severità sia del sintomo ipotensione ortostatica che del dominio complessivo dei sintomi cardiovascolari registrati all'NMSS suggerisce come la metodica HRV possa effettivamente avere un impiego pratico nel correlare i disturbi sintomatici riferiti dal paziente con un sistema di valutazione obiettivo. Sulla scorta di tale evidenza, l'utilizzazione di questo esame potrebbe essere utile anche nell'ottica di monitorare differenti strategie terapeutiche così come per monitorare nel tempo l'eventuale evoluzione del disturbo, che come sappiamo segue una distribuzione nel tempo molto differente dal classico disturbo motorio.

Il nostro studio non si è però limitato a determinare la presenza di un alterato balance simpato-vagale ma è stato volto a determinare se questo dato potesse riflettersi sulla contrattilità miocardica. Al momento attuale, infatti, gli effetti funzionali della denervazione simpatica cardiaca sono largamente sconosciuti [Imrich et al, 2008]. A tal fine abbiamo utilizzato lo studio ecocardiografico con la metodica ST per la valutazione di Strain e SR sia in condizioni basali che sotto sforzo.

Questo esame rappresenta una novità assoluta nello studio di eventuali deficit della contrattilità miocardica nei pazienti con MP.

Esistono, infatti, in letteratura solo alcuni lavori che hanno utilizzato la metodica ecocardiografica da stress nella MP. Nei precedenti lavori la valutazione dinamica è stata eseguita utilizzando uno stimolo farmacologico (dobutamina o isoproterenolo) [Buop, 2010], mentre nel nostro studio è stato impiegato un approccio più fisiologico e non invasivo come l'ecocardiografia da sforzo con letto ergometro.

I nostri dati hanno evidenziato come in entrambi i gruppi della popolazione affetta da MP sia presente una riduzione della riserva contrattile presente già ai bassi carichi lavorativi per divenire significativa al picco dello sforzo.

Particolarmente interessante risulta l'evidenza di una stretta correlazione tra la ridotta riserva contrattile ed il rapporto LF/HF, seppur nel solo gruppo correlato a mutazione LRRK2, ad

evidenziare l'influenza dell'alterato bilanciamento simpatovagale presente in questi pazienti sul miocardio del ventricolo sinistro.

Il dato di una ridotta riserva contrattile nella MP idiopatica rappresenta già un dato parzialmente conosciuto seppur studiato con differenti metodiche [Imrich et al, 2008, Nakamura et al, 2010].

Nel primo studio, condotto su pazienti affetti da MP idiopatica allo scopo di verificare gli effetti funzionali della denervazione simpatica cardiaca, fu registrata una ridotta risposta a stimoli di tipo farmacologico sul miocardio ventricolare che suggerì l'ipotesi di una ridotta riserva contrattile, correlando questi effetti ad un verosimile ridotto rilascio di norepinefrina a livello delle terminazioni miocardiche [Imrich et al, 2008].

Inoltre, più recentemente, lo studio di Nakamura et al [2010] ha messo in evidenza come nella MP sia presente una ridotta risposta inotropica all'esercizio fisico, già presente ai bassi carichi lavorativi. La ridotta contrattilità cardiaca altro non sarebbe, secondo questo studio, che una deficitaria capacità all'esercizio dei pazienti parkinsoniani con denervazione simpatica cardiaca.

I nostri dati mettono per la prima volta in evidenza questo fenomeno in una popolazione affetta da MP associata a mutazioni del gene LRRK2. In questa peculiare forma appaiono essere correlati principalmente ad una più complessa alterazione del balance simpato-vagale rispetto a quella classicamente individuata nella forma idiopatica di malattia in seguito a ridotta stimolazione adrenergica a livello delle terminazioni simpatiche miocardiche.

Infine, deve essere stressato il concetto di come i rilievi di associazione statistica rilevati, come nel caso della relazione tra ridotta riserva contrattile e le alterazioni del balance simpato-vagale nella popolazione genetica LRRK2, forniscano una chiara evidenza di come la migliore caratterizzazione genetica consenta di poter esaminare questa particolare tipologia di pazienti con una maggior definizione diagnostica

Tale dato rappresenta un'ulteriore conferma di come, probabilmente, la MP altro non sia che una dizione comune per comprendere un insieme di più "malattie di Parkinson", ognuna con le sue peculiari caratteristiche fenotipiche e anatomopatologiche.

È logico intuire come la più precisa e puntuale definizione di ciascuna di queste "malattie" con le proprie e specifiche tipicità, comporterà nei prossimi anni una radicale modificazione dell'approccio terapeutico in tali pazienti.

## **TAVOLE, TABELLE E FIGURE**

**Tavola 1. Loci monogenici per la malattia di Parkinson**

Locus genico	Gene	Prodotto del gene	Trasmissione	Età all'esordio	Bibliografia
<b>PARK1/PARK4</b>	SNCA	$\alpha$ -sinucleina	Autosomica Dominante	Mutazioni missense: da 30 a 60 anni	Polymeropoulos et al, 1997; Singleton et al, 2003.
<b>PARK2</b>	PARK2	Parkina	Autosomica Recessiva	Ampio range dalla I alla V decade	Kitada et al, 1998
<b>PARK6</b>	PINK1	Pten-induced kinase 1	Autosomica Recessiva	30-50 anni	Valente et al, 2004
<b>PARK7</b>	PARK7	DJ1	Autosomica Recessiva	20-40 anni	Bonifati et al, 2003
<b>PARK8</b>	LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2	Autosomica Dominante	Ampio dai 30 ai 50 anni	Paisan-Ruiz et al, 2004; Zimprich et al, 2004.
<b>PARK9</b>	ATP13A2	ATPase type 13A2	Autosomica Recessiva	Tra 10 e 22 anni	Ramirez et al, 2004
<b>PARK14</b>	PLA2G6	Fosfolipasi A2, gruppo VI	Autosomica Recessiva	MP prima decade, Distonia/parkinsonismo da 20 anni	Paisan-Ruiz et al, 2009
<b>PARK15</b>	FBX07	F-box protein 7	Autosomica Recessiva	Adolescenza tardiva	Di Fonzo et al, 2009
<b>PARK17</b>	VPS35	Vacuolar protein sorting 35 homolog	Autosomica Dominante	40-50 anni	Vilarino-Guell et al, 2011; Zimprich et al, 2011
	PANK2	Pantotenato kinasi 2	AR	Tipo classico I decade, Parkinsonismo dai 20 anni	Zhou et al, 2001; Thomas et al, 2004

Modificato da Houlden H, Singleton AB. *The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. Acta Neuropathol.* 2012 ;124(3):325-38.

**Tavola 2. Sintomi non motori nella malattia di Parkinson**

<b>Sintomi neuropsichiatrici</b>	<b>Sintomi gastrointestinali (sovrapposizione con i sintomi autonomici)</b>
Depressione Apatia Ansia Anedonia Deficit attentivi Allucinazioni Deliri Demenza Comportamenti ossessivi (punding)	Perdita di saliva Ageusia Disfagia Reflusso Vomito Nausea Stipsi Incompleto svuotamento intestinale Incontinenza fecale
<b>Disturbi del sonno</b>	<b>Sintomi sensitivi</b>
Sindrome delle gambe senza riposo Movimenti periodici degli arti Disturbo comportamentale in sonno REM Eccessiva sonnolenza diurna Sogni lucidi Disturbi del movimento nel sonno non-REM Insonnia	Dolore Parestesie Disturbi olfattivi
<b>Sintomi autonomici</b>	<b>Altri sintomi</b>
<i>Disfunzioni vescicali</i> Urgenza Nicturia Frequenza <i>Disautonomia cardiovascolare</i> Ipotensione ortostatica Dolore cervicale-spalle Episodi sincopali <i>Disfunzioni sessuali</i> Ipersessualità Disfunzione erettile Ipotestosteronemia Andropausa <i>Sudorazione</i>	Fatica Diplopia Visione offuscata Seborrea Perdita di peso

**Legenda:** REM: Rapid Eye Movement.  
 Adattata da Chaudury et al.  
 Lancet Neurol. 2006;5:235-245

**Tabella 1. Caratteristiche cliniche e motorie dei pazienti affetti da malattia di Parkinson inclusi nel nostro studio.**

<b>Caratteristiche esaminate</b>	
<b>Numero dei soggetti</b>	415
<b>Sesso maschile, N (%)</b>	240 (57,8)
<b>Anni all'osservazione, anni (DS)</b>	68,8 (9,3)
<b>Durata della MP, anni (DS)</b>	6,1 (3,9)
<b>H&amp;Y stage, punteggio medio, (DS)</b>	2,2 (0,7)
<b>UPDRS-III punteggio totale medio, (DS)</b>	27,4 (15,0)
<b>UPDRS-III (subscore Tremore) (DS)</b>	4,9 (4,1)
<b>UPDRS-III (subscore Rigidità) (DS)</b>	4,8 (3,7)
<b>UPDRS-III (subscore Bradicinesia) (DS)</b>	12,4 (7,5)
<b>UPDRS-III (subscore postura/instabilità) (DS)</b>	3,3 (2,9)
<b>Forma tremorigena all'esordio, N (%)</b>	339 (81,4)
<b>Forma rigido-cinetica all'esordio, N (%)</b>	76 (18,6)
<b>Fluttuazioni, N (%)</b>	175 (42,1)
<b>Discinesie, N (%)</b>	101 (24,3)
<b>DGLE Levodopa, mg/die (DS)</b>	385,3 (318,0)
<b>DGLE Dopamino agonisti, mg/die (DS)</b>	82,9 (89,9)
<b>DGLE Totale, mg/die (DS)</b>	489,4 (338,8)

**Legenda:** N, numero pazienti; DS, Deviazione Standard; MP, Malattia di Parkinson; UPDRS-III, Unified Parkinson's disease rating scale, sezione III; H&Y, Hoehn and Yahr scale, DGLE, Dose giornaliera levodopa equivalente.

**Tabella 2. Frequenza e severità dei sintomi non motori, valutati alla Non motor Symptoms Scale (NMSS), nei pazienti affetti da malattia di Parkinson della nostra casistica per singolo items.**

Items NMSS	N° pazienti (%)	Severità
1. Ipotensione ortostatica	208 (50,1)	2,5 (3,7)
2. Episodi sincopali	22 (5,3)	0,2 (1,5)
3. Sonnolenza diurna	225 (54,2)	3,1 (4,0)
4. Fatica	279 (67,2)	4,7 (4,7)
5. Difficoltà addormentamento	164 (39,5)	2,7 (4,1)
6. Sindrome gambe senza riposo	133 (32,0)	2,0 (3,7)
7. Perdita di interesse per l'esterno	134 (32,3)	1,9 (3,5)
8. Perdita di motivazione	105 (25,3)	1,8 (3,6)
9. Ansia	179 (43,1)	2,5 (3,6)
10. Umore depresso	211 (50,8)	2,9 (3,9)
11. Apatia	135 (32,5)	1,9 (3,6)
12. Ane donia	93 (22,4)	1,3 (3,0)
13. Allucinazioni	46 (11,1)	0,5 (1,7)
14. Deliri	4 (1,0)	0,0 (0,4)
15. Visione doppia	44 (10,6)	0,5 (1,9)
16. Concentrazione	178 (42,9)	2,4 (3,8)
17. Dimenticare cose o eventi	205 (49,4)	2,6 (3,8)
18. Dimenticare di fare le cose	167 (40,2)	1,6 (3,0)
19. Salivazione	120 (28,9)	1,6 (3,2)
20. Deglutizione	128 (30,8)	1,5 (3,0)
21. Stipsi	191 (46,0)	2,9 (4,2)
22. Urgenza minzionale	189 (45,5)	3,3 (4,6)
23. Incontinenza urinaria	177 (42,7)	3,2 (4,6)
24. Nicturia	292 (70,4)	4,7 (4,6)
25. Alterato interesse sessuale	69 (16,6)	0,9 (2,5)
26. Disturbi rapporto sessuale	21 (5,1)	0,3 (1,6)
27. Dolore	83 (20,0)	1,3 (3,0)
28. Ageusia o iposmia	170 (41,0)	2,9 (4,2)
29. Variazione di peso	56 (13,5)	0,6 (2,0)
30. Eccessiva sudorazione	125 (30,1)	2,0 (3,6)
NMSS (Tutti gli items)	415 (100)	60,5 (45,5)

**Legenda:** MP, malattia di Parkinson; NMSS, Non Motor Symptoms Scale.

**Tabella 3. Correlazione tra sintomi disautonomici cardiovascolari, rilevati alla NMSS, sia come singoli item che come dominio complessivo, con caratteristiche cliniche e sintomi motori nei pazienti affetti da malattia di Parkinson del nostro studio.**

Items NMSS	Item 1 Ipotensione ortostatica		Item 2 Episodi sincopali		Dominio 1 Sintomi Cardiovascolari	
	r	p	R	p	r	p
Anni all'osservazione	0,011	0,830	0,050	0,468	0,026	0,597
Durata della MP	-0,088	0,074	0,051	0,297	-0,090	0,067
H&Y stage	<b>-0,104</b>	<b>0,033</b>	0,050	0,305	<b>-0,102</b>	<b>0,037</b>
UPDRS-III punteggio totale	-0,027	0,590	0,046	0,795	-0,026	0,593
UPDRS-III - subscore Tremore	0,045	0,361	0,001	0,984	0,038	0,444
UPDRS-III - subscore Rigidità	-0,032	0,521	0,007	0,888	-0,024	0,061
UPDRS-III - subscore Bradicinesia	-0,028	0,574	0,014	0,742	-0,028	0,563
UPDRS-III - subscore Postura/instabilità	-0,053	0,281	0,016	0,484	-0,056	0,258
DGLE Levodopa	-0,032	0,510	-0,002	0,972	-0,028	0,576
DGLE Dopamino agonisti	-0,047	0,337	<b>-0,130</b>	<b>0,008</b>	-0,083	0,092
DGLE Totale	-0,051	0,304	-0,046	0,347	-0,048	0,242

**Legenda:** r, coefficiente di correlazione, P, significatività; MP, Malattia di Parkinson; UPDRS-III, Unified Parkinson's disease rating scale, sezione III; H&Y, Hoehn and Yahr scale, DGLE, Dose giornaliera levodopa equivalente.

*In grassetto, correlazioni con  $p < 0,05$*

**Tabella 4. Correlazione tra sintomi disautonomici cardiovascolari con altri sintomi non motori rilevati alla NMSS nei pazienti affetti da malattia di Parkinson del nostro studio.**

Items NMSS	Ipotensione ortostatica		Lipotimia	
	r	p	r	p
3. Sonnolenza diurna	0,193	<b>0,005</b>	0,193	<b>0,005</b>
4. Fatica	0,341	<b>0,001</b>	0,209	<b>0,002</b>
5. Difficoltà addormentamento	0,160	0,020	0,184	0,007
6. Sindrome gambe senza riposo	0,172	0,012	0,303	<b>0,001</b>
7. Perdita di interesse	0,272	<b>0,001</b>	0,238	<b>0,000</b>
8. Perdita di motivazione	0,267	<b>0,001</b>	0,224	<b>0,001</b>
9. Ansia	0,202	<b>0,003</b>	0,232	<b>0,001</b>
10. Umore depresso	0,323	<b>0,001</b>	0,363	<b>0,001</b>
11. Apatia	0,254	<b>0,000</b>	0,267	<b>0,001</b>
12. Aneidonia	0,233	<b>0,001</b>	0,147	0,032
13. Allucinazioni	0,047	0,500	-0,037	0,589
14. Deliri	-0,009	0,893	-0,011	0,870
15. Visione doppia	0,091	0,186	0,089	0,196
16. Concentrazione	0,138	0,045	0,092	0,184
17. Dimenticare cose o eventi	0,211	<b>0,002</b>	0,199	<b>0,004</b>
18. Dimenticare di fare le cose	0,064	0,352	0,181	0,008
19. Salivazione	0,133	0,054	0,127	0,066
20. Deglutizione	0,184	0,007	0,297	<b>0,001</b>
21. Stipsi	0,249	<b>0,001</b>	0,342	<b>0,001</b>
22. Urgenza minzionale	0,141	0,040	0,129	0,061
23. Incontinenza urinaria	0,112	0,104	0,116	0,093
24. Nicturia	0,120	0,082	0,064	0,354
25. Alterato interesse sessuale	0,040	0,559	-0,014	0,840
26. Disturbi rapporto sessuale	0,017	0,809	-0,025	0,713
27. Dolore	0,128	0,063	0,012	0,859
28. Ageusia o iposmia	0,175	0,001	0,071	0,301
29. Variazione di peso	0,371	<b>0,001</b>	0,463	<b>0,001</b>
30. Eccessiva sudorazione	0,102	0,138	0,212	0,002
NMSS punteggio totale	0,403	<b>0,001</b>	0,396	<b>0,001</b>

**Legenda:** r, coefficiente di correlazione, P, significatività; NMSS, Non Motor Symptoms Scale.

**In grassetto, correlazioni con  $p < 0,005$**

**Tabella 5. Caratteristiche cliniche e motorie dei pazienti con malattia di Parkinson in rapporto alla presenza/assenza di mutazioni del gene LRRK2.**

Caratteristiche esaminate	Pazienti con MP		<i>p</i>
	LRRK2 -	LRRK2 +	
<b>Numero dei soggetti</b>	405	10	NV
<b>Sesso maschile, N (%)</b>	234 (57,9)	6 (60)	0,584
<b>Anni all'osservazione, anni (DS)</b>	68,8 (9,3)	69,6 (12,9)	0,854
<b>Durata della MP, anni (DS)</b>	6,0 (3,9)	7,9 (4,3)	0,211
<b>H&amp;Y stage, punteggio medio, (DS)</b>	2,2 (0,7)	2,3 (0,8)	0,815
<b>UPDRS-III punteggio totale medio, (DS)</b>	27,2 (14,9)	34,2 (17,8)	0,228
<b>UPDRS-III-subscore Tremore, (DS)</b>	4,8 (4,1)	5,0 (5,4)	0,912
<b>UPDRS-III-subscore Rigidità, (DS)</b>	4,7 (3,7)	5,7 (3,8)	0,097
<b>UPDRS-III-subscore Bradicinesia, (DS)</b>	12,3 (7,5)	14,8 (7,1)	0,307
<b>UPDRS-III-subscore postura/instabilità, (DS)</b>	3,3 (2,8)	4,4 (3,8)	0,321
<b>Forma con componente tremorigena, N (%)</b>	331 (81,7)	8 (80)	0,889
<b>Fluttuazioni, N (%)</b>	169 (41,7)	6 (60)	0,247
<b>Discinesie, N (%)</b>	98 (24,2)	3 (30)	0,627
<b>DGLE Levodopa, mg/die (DS)</b>	383,1 (319,8)	474,0 (225,8)	0,373
<b>DGLE Dopamino Agonisti, mg/die (DS)</b>	81,9 (88,7)	125,1 (109,7)	0,130
<b>DGLE Totale, mg/die (DS)</b>	485,4 (338,3)	651,1 (333,9)	0,127

**Legenda:** N, numero pazienti; DS, Deviazione Standard; MP, Malattia di Parkinson; UPDRS-III, Unified Parkinson's disease rating scale, sezione III; H&Y, Hoehn and Yahr scale, DGLE, Dose giornaliera levodopa equivalente.

**Tabella 6. Severità dei sintomi non motori, valutati alla Non motor Symptoms Scale (NMSS), e suddivisi in pazienti affetti da malattia di Parkinson con o senza mutazioni del gene LRRK2, riportati per singolo item.**

Items NMSS	LRRK2-	LRRK2 +	p	Items NMSS	LRRK2-	LRRK2 +	p
	Score (DS)	Score (DS)			Score (DS)	Score (DS)	
1. Ipotensione ortostatica	2,6 (3,7)	1 (1,4)	,007	16. Concentrazione	2,4 (3,7)	0,8 (1,9)	,024
2. Sincope	0,3 (1,5)	0 (0)	,001	17. Dimenticare cose o eventi	2,6 (3,7)	2,6 (4,4)	,980
3. Sonnolenza diurna	3,2 (3,9)	0,6 (1,3)	,001	18. Dimenticare di fare le cose	1,5 (3,0)	2,4 (3,9)	,528
4. Fatica	4,7 (4,7)	2,7 (4,2)	,177	19. Salivazione	1,6 (3,2)	0,2 (0,6)	,001
5. Difficoltà addormentamento	2,7 (4,1)	2,4 (4,3)	,839	20. Deglutizione	1,5 (3,0)	0,1 (0,3)	,000
6. Sindrome gambe senza riposo	2,1 (3,7)	1,4 (2,5)	,578	21. Stipsi	2,9 (4,1)	3,4 (4,7)	,756
7. Perdita di interesse	2,0 (3,5)	0,6 (1,3)	,012	22. Urgenza minzionale	3,3 (4,6)	1,9 (3,3)	,207
8. Perdita di motivazione	1,8 (3,6)	1,4 (3,7)	,766	23. Incontinenza urinaria	3,2 (4,6)	1,8 (3,2)	,203
9. Ansia	2,5 (3,7)	2,1 (2,7)	,652	24. Nicturia	4,7 (4,6)	4,4 (4,4)	,831
10. Umore depresso	3,0 (3,9)	1,1 (1,7)	,006	25. Alterato interesse sessuale	0,9 (2,5)	0,1 (0,3)	,001
11. Apatia	2,0 (3,6)	0,7 (1,9)	,066	26. Disturbi rapporto sessuale	0,3 (1,5)	0,1 (0,3)	,460
12. Agedonia	1,3 (3,1)	0,8 (2,5)	,517	27. Dolore	1,3 (3,0)	0,9 (1,4)	,705
13. Allucinazioni	0,5 (1,7)	0 (0)	,001	28. Ageusia o iposmia	2,9 (4,2)	1,3 (2,7)	,093
14. Deliri	0 (0,3)	0 (0)	,753	29. Variazione di peso	0,6 (2,0)	0 (0)	,000
15. Visione doppia	0,5 (1,9)	0,2 (0,6)	,587	30. Eccessiva sudorazione	2,0 (3,5)	0,6 (1,9)	,045
NMSS punteggio totale	61,1 (45,7)	35,6 (26,2)	,014				

**Legenda:** NMSS, Non Motor Symptoms Scale. MP, malattia di Parkinson; LRRK2-; Pazienti affetti da MP senza mutazioni del gene LRRK2; LRRK2+; Pazienti affetti da MP con mutazioni del gene LRRK2;

**Tabella 7. Caratteristiche cliniche dei pazienti con malattia di Parkinson, con e senza mutazioni del gene LRRK2, e dei controlli sani inclusi nella casistica HRV/studio ecografico**

	Pazienti affetti da MP LRRK2-	Pazienti affetti da MP LRRK2+	Controlli sani
<b>Numero dei soggetti studiati</b>	16	8	8
<b>Sesso Maschile, N (%).</b>	8 (50)	4 (50)	4 (50)
<b>Altezza, m (DS)</b>	1,67 (0,6)	1,64 (0,5)	1,65 (0,3)
<b>Peso, Kg (DS)</b>	69,3 (26,2)	69,0 (25,0)	71,89 (24,8)
<b>Età all'osservazione, anni (DS)</b>	65,0 (7,1)	64,6 (11,4)	63,9 (9,2)
<b>Durata di malattia anni (DS)</b>	8,1 (5,4)	8,2 (5,7)	NA
<b>Score, Hoehn and year, media (DS)</b>	2,3 (0,9)	2,4 (0,9)	NA
<b>Score UPDRS- III, media (DS)</b>	32,4 (18,7)	33,2 (18,9)	NA
<b>Caratteristiche cliniche</b>			NA
<b>Forma tremorigena, N (%).</b>	12 (75%)	6 (75%)	NA
<b>Forma rigido-acinetica, N (%).</b>	4 (25%)	2 (25%)	NA
<b>DGLE totale, mg/die (DS)</b>	424,7 (303,6)	446,7 (323,8)	NA
<b>DGLE dopamino agonisti, mg/die (DS)</b>	62,3 (155,6)	65,6 (191,6)	NA
<b>Levodopa, mg/die (DS)</b>	362,4 (273,1)	381,6 (303,2)	NA

**Legenda:** MP, Malattia di Parkinson; DS, Deviazione Standard; NA, non applicabile; Unified Parkinson's disease rating scale, sezione III; H&Y, Hoehn and Yahr scale; DGLE, Dosaggio Giornaliero Levodopa Equivalente.

**Tabella 8. Risultati studio HRV in pazienti affetti da malattia di Parkinson, con e senza mutazioni del gene LRRK2, e dei controlli sani inclusi nella casistica HRV.**

	Pazienti affetti da MP LRRK2-	Pazienti affetti da MP LRRK2+	Controlli sani	p
<i>Time domain</i>				
<b>SDNN (DS)</b>	112,58 (30,29)	117,45 (50,52)	99,36 (61,85)	NS
<b>RMS-SD (DS)</b>	30,54 (11,89)	40,80 (32,82)	27,26 (12,12)	NS
<b>SDSD (DS)</b>	24,81 (11,63)	31,09 (25,37)	19,12 (8,31)	NS
<b>HRV-Index (DS)</b>	14,94 (4,00)	16,20 (8,07)	17,28 (7,69)	NS
<b>TINN (DS)</b>	459,99 (129,97)	485,45 (259,27)	523,88 (237,59)	NS
<b>pNN50 (DS)</b>	4,07 (3,22)	10,51 (15,36)	5,40 (4,67)	NS
<i>Frequency domain</i>				
<b>LF 24 ore (DS)</b>	262,2 (57,0)	486,1 (273,0)	348,6 (104,4)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,001 LRRK2- vs CONTROL p<0,001 LRRK2 + vs CONTROL p<0,02
<b>HF 24 ore (DS)</b>	157,5 (71,8)	415,0 (216,8)	189,7 (68,0)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,001 LRRK2- vs CONTROL p<0,001
<b>LF/HF 24 ore (DS)</b>	2,23 (0,51)	2,24 (0,78)	2,83 (0,80)	LRRK2- vs CONTROL p<0,004 LRRK2 + vs CONTROL p<0,01
<b>LF ore diurne (DS)</b>	262,2 (42,5)	412,0 (183,1)	348,6 (104,4)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,001; LRRK2- vs CONTROL p<0,001;
<b>HF ore diurne (DS)</b>	126,1 (51,4)	340,9 (134,4)	158,3 (56,3)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,0001 LRRK2 + vs CONTROL p<0,001
<b>LF/HF ore diurne (DS)</b>	2,49 (0,38)	2,54 (0,75)	3,15 (0,60)	LRRK2- vs CONTROL p<0,001; LRRK2 + vs CONTROL p<0,02
<b>LF ore notturne (DS)</b>	302,3 (70,7)	665,9 (378,1)	419,7 (121,5)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,02
<b>HF ore notturne (DS)</b>	233,5 (56,2)	594,9 (280,5)	256,8 (32,9)	LRRK2- vs LRRK2+ p<0,005; LRRK2 + vs CONTROL p<0,007
<b>LF/HF ore notturne (DS)</b>	1,78 (0,39)	1,62 (0,34)	2,21 (0,81)	NS

**Legenda.** SDNN: deviazione standard degli intervalli NN nelle 24 ore ; RMSSD radice quadrata degli scarti quadratici medi tra intervalli RR successivi; SDSD: standard deviation of successive normal sinus RR interval difference; HRV-index; Heart rate variability index; TINN: triangular Index; pNN50: proporzione del numero delle differenze più ampie di 50 msec di intervalli RR adiacenti; LF, low frequency; HF, high frequency; LF/HF: rapporto LF/HF; LRRK2- pazienti con malattia di Parkinson senza mutazioni LRRK2; LRRK2+ pazienti con malattia di Parkinson con mutazioni LRRK2; Control, Controlli: NS; non significativo.

**Tabella 9. Correlazione tra parametri HRV e sintomi disautonomici rilevati all'NMSS in pazienti affetti da malattia di Parkinson senza mutazioni del gene LRRK2.**

	LF/HF ratio		LF		HF	
	r	p	r	p	r	p
<b>Item NMSS</b>						
<b>1 Ipotensione ortostatica</b>	-0,462	<b>0,041</b>	-0,116	0,626	-0,347	0,134
<b>2 Sincope</b>	-0,362	0,117	0,334	0,150	0,103	0,664
<b>Dominio NMSS</b>						
<b>Cardiovascolare</b>	<b>-0,467</b>	<b>0,038</b>	-0,042	0,860	0,217	0,358

**Legenda:** MP, malattia di Parkinson; NMSS, Non Motor Symptoms Scale.

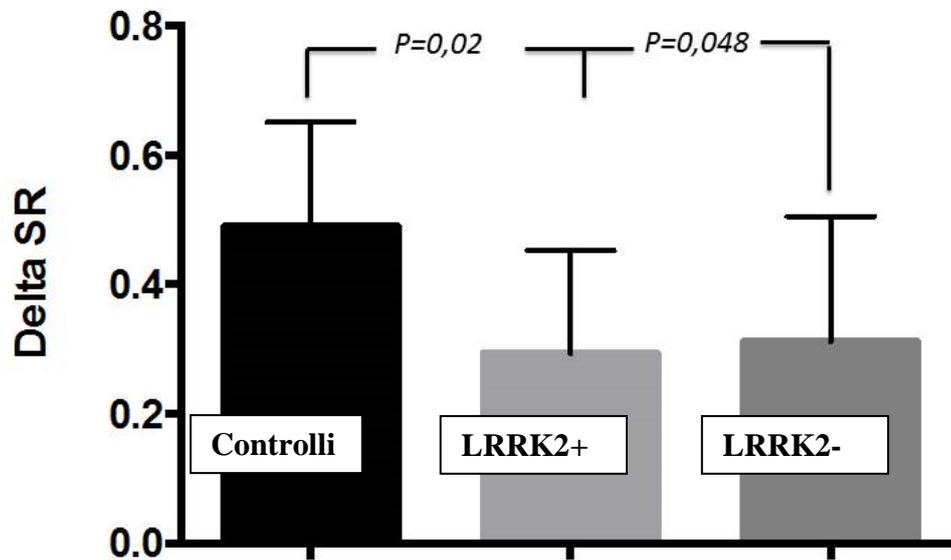
In grassetto, correlazioni con **p<0,005**

**Tabella 10. Parametri ecocardiografici basali di funzione sistolica e diastolica nelle tre sottopopolazioni del nostro studio.**

	Pazienti affetti da MP LRRK2-	Pazienti affetti da MP LRRK2+	Controlli sani	p
<b>Funzione sistolica</b>				
<b>LVEF (%)</b>	62 (4)	63 (3)	65 (4)	NS
<b>Onda S (cm/sec)</b>	8,2 (2)	7,14 (3,1)	7,67 (4,05)	NS
<b>Funzione diastolica</b>				
<b>E/A</b>	1,06 (0,28)	0,80 (0,30)	0,95 (0,40)	NS
<b>DecT (msec)</b>	0,190 (0,05)	0,236 (0,096)	0,213 (0,078)	NS
<b>E/E1</b>	9,4 (1,7)	11,86 (5,1)	8,52 (3,19)	0,02
<b>Ecocardiografia da sforzo</b>				
<b>Carico di lavoro (Watts)</b>		63,00 (33,73)	103,75 (40,55)	0,01

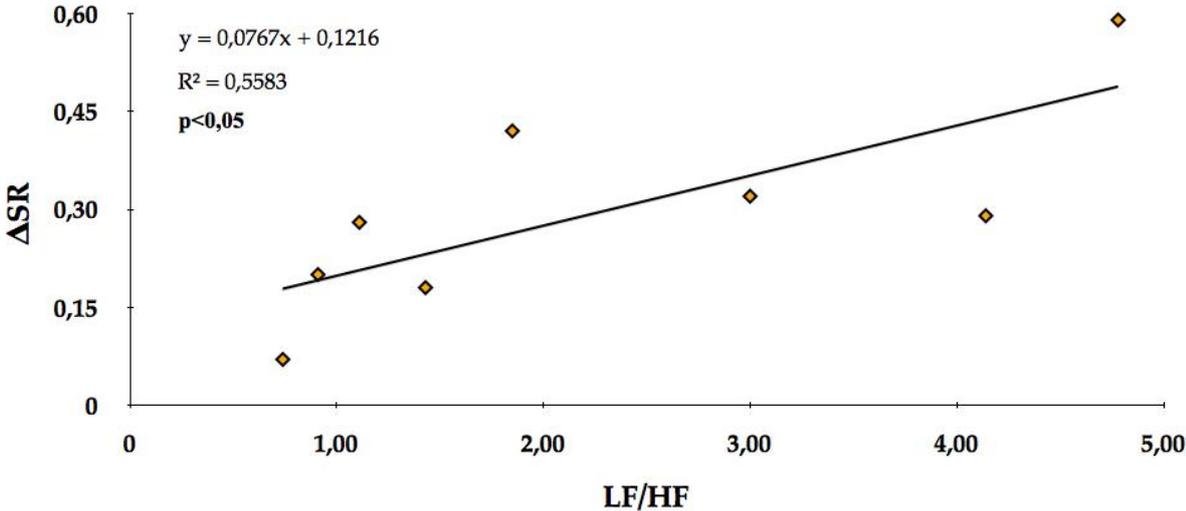
**Legenda.** LVEF, Frazione di eiezione ventricolo sinistro; E/A, early and late diastolic peak velocity ratio; DecT: Deceleration time.

**Figura 1. Delta Strain rate misurato al picco (rispetto ai valori basali) nelle tre sottopopolazioni di pazienti esaminati**



**Legenda:** SR; Strain rate; LRRK2+, pazienti con mutazione genetica del gene LRRK2; LRRK2-, pazienti senza mutazione genetica del gene LRRK2.

**Figura 2: Correlazione tra  $\Delta$ s Strain rate e rapporto LF/HF nel gruppo dei pazienti con parkinsonismo genetico LRRK2**



## **Bibliografia.**

Aasly JO, Toft M, Fernandez-Mata I, Kachergus J, Hulihan M, White LR, Farrer M. Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway. *Ann Neurol.* 2005 May;57(5):762-5.

Adler CH. Nonmotor complications in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005;20 Suppl 11:S23-9.

Aerts MB, Synhaeve NE, Mirelman A, Bloem BR, Giladi N, Hausdorff JM. Is heart rate variability related to gait impairment in patients with Parkinson's disease? A pilot study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 Nov;15(9):712-5.

Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M. Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr Gerontol Int.* 2010. Suppl 1:S148-57

Appenzeller O, Goss JE. Autonomic deficits in Parkinson's syndrome. *Arch Neurol.* 1971 Jan;24(1):50-7.

Assessment: clinical autonomic testing report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American academy of neurology. *Neurology.* 1996;46:873-880

Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*2000;55:1358-63.

Bannister R, Oppenheimer DR. Degenerative diseases of the nervous system associated with autonomic failure. *Brain* 1972;95:457-474

Barbic F, Perego F, Canesi M, Gianni M, Biagiotti S, Costantino G, Pezzoli G, Porta A, Malliani A, Furlan R. Early abnormalities of vascular and cardiac autonomic control in Parkinson's disease without orthostatic hypotension. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):120-6.

Bardien S, Lesage S, Brice A, Carr J. Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17:501–508.

Bianchi AM, Bontempi B, Cerutti S, Gianoglio P, Comi G, Natali Sora MG. Spectral analysis of heart rate variability signal and respiration in diabetic subjects. *Med Biol Eng Comput* 1990;28: 205-211.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299:256–259.

Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2012;211:51–76.

Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976–1990. *Neurology* 1999;52: 1214-20.

Braak H, De Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett*. 2006; 396(1): 67–72.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2):197-211.

Bras JM, Guerreiro RJ, Ribeiro MH et al. G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort. *Mov Disord* 2005; 20:1653–1655

Buob A, Winter H, Kindermann M, Becker G, Möller JC, Oertel WH, Böhm M. Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease. *Clin Res Cardiol.* 2010 Nov;99(11):701-6.

Burn DJ. Depression in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2002 Nov;9 Suppl 3:44-54

Calne DB, Peppard RF. Aging of the nigrostriatal pathway in humans. *Can J Neurol Sci.* 1987 Aug;14(3 Suppl):424-7

Cannas A, Borghero G, Floris GL, Solla P, Chiò A, Traynor BJ, Calvo A, Restagno G, Majounie E, Costantino E, Piras V, Lavra L, Pani C, Orofino G, Di Stefano F, Tacconi P, Mascia MM, Muroli A, Murru MR, Tranquilli S, Corongiu D, Rolesu M, Cuccu S, Marrosu F, Marrosu MG. The p.A382T TARDBP gene mutation in Sardinian patients affected by Parkinson's disease and other degenerative parkinsonisms. *Neurogenetics.* 2013 Apr 2.

Chartier-Harlin M-C, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, et al. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2011;89:398–406.

Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006 Mar;5(3):235-45.

Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Brown RG, Sethi K, Stocchi F, Odin P, Ondo W, Abe K, Macphee G, Macmahon D, Barone P, Rabey M, Forbes A, Breen K, Tluk S, Naidu Y, Olanow W, Williams AJ, Thomas S, Rye D, Tsuboi Y, Hand A, Schapira AH. The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: Results from an international pilot study. *Mov Disord.* 2007 Oct 15;22(13):1901-11.

Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 464–474.

Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: time for a comprehensive assessment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;5: 275–283

Cossu G, van Doeselaar M, Deriu M, Melis M, Molari A, Di Fonzo A, Oostra BA, Bonifati V. LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Sardinia--A Mediterranean genetic isolate. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007 Feb;13(1):17-21.

Covassin N, Neikrug AB, Liu L, Maglione J, Natarajan L, Corey-Bloom J, Loredó JS, Palmer BW, Redwine LS, Ancoli-Israel S. Relationships between clinical characteristics and nocturnal cardiac autonomic activity in Parkinson's disease. *Auton Neurosci.* 2012 Nov 2;171(1-2):85-8.

Criscuolo C, De Rosa A, Guacci A, Simons EJ, Breedveld GJ, Peluso S, Volpe G, Filla A, Oostra BA, Bonifati V, De Michele G. The LRRK2 R1441C mutation is more frequent than G2019S in Parkinson's disease patients from southern Italy. *Mov Disord.* 2011 Aug 1;26(9):1733-6.

Crosiers D, Pickut B, Theuns J, Deyn PP, Van Broeckhoven C, Martinez-Martin P, Chaudhuri KR, Cras P. Non-motor symptoms in a Flanders-Belgian population of 215 Parkinson's disease patients as assessed by the Non-Motor Symptoms Questionnaire. *Am J Neurodegener Dis.* 2012;1(2):160-7.

Dagher A, Robbins TW. Personality, addiction, dopamine: insights from Parkinson's disease. *Neuron.* 2009; 61(4):502-10

Deng H, Le W, Guo Y, Hunter CB, Xie W, Huang M, Jankovic J. Genetic analysis of LRRK2 mutations in patients with Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 2006 Nov 8

De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5:525–535.

De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology.* 2000;54:S21–S23.

Devos D, Kroumova M, Bordet R, Vodougnon H, Guieu JD, Libersa C, Destee A. Heart rate variability and Parkinson's disease severity. *J Neural Transm.* 2003 Sep;110(9):997-1011.

Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P et al. *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009; 72:240–245.

Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J et al. A frequent *LRRK2* gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365:412–415.

Di Monte DA. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* 2003 Sep;2(9):531-8.

Dissanayaka NNW, Sellbach A, Matheson S, O'Sullivan JD, Silburn PA, Byrne GJ, et al. Anxiety disorders in Parkinson's disease: prevalence and risk factors. *Mov. Disord.* 15 2010; 25(7):838–45.

Ewing DJ. Analysis of heart rate variability and other non-invasive tests with special reference to diabetic mellitus. In: Bannister R, Mathias CJ, (eds) *Autonomic failure. A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system.* 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, NY, 1992;312-333

Ferini-Strambi L, Franceschi M, Pinto P, Zucconi M, Smirne S. Respiration and heart rate variability during sleep in untreated Parkinson patients. *Gerontology*. 1992;38(1-2):92-8.

Ferrer I, Martinez A, Blanco R, Dalfó E, Carmona M. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. *J Neural Transm*. 2011; 118(5):821-39

Floris G, Cannas A, Solla P, Murru MR, Tranquilli S, Corongiu D, Rolesu M, Cuccu S, Sardu C, Marrosu F, Marrosu MG. Genetic analysis for five LRRK2 mutations in a Sardinian parkinsonian population: Importance of G2019S and R1441C mutations in sporadic Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2009. 15:277–280.

Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*. 2002 Mar;51(3):296-301.

Galpern WR, Lang AE, Gilks et al., 2006; Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):449-58.

Gasser T. Molecular genetic findings in LRRK2 American, Canadian and German families. *J Neural Transm Suppl*. 2006;(70):231-4.

Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 1999;56:33–39.

Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005, 365:415–416.

Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N,

Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*. 2008 Aug 26;71(9):670-6.

Goldstein DS et al., 2007. Cardiac sympathetic denervation preceding motor signs in Parkinson disease. *Clin. Auton. Res.* 17, 118–121

Goldstein DS, Holmes C, Benth O, Sato T, Moak J, Sharabi Y, Imrich R, Conant S, Eldadah BA. Biomarkers to detect central dopamine deficiency and distinguish Parkinson disease from multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008 Dec;14(8):600-7.

Goldstein DS. Orthostatic hypotension as an early finding in Parkinson disease. *Clin. Auton. Res.*, 16 (2006), pp. 46–64

Goldwurm S, Zini M, Di Fonzo A, De Gaspari D, Siri C, Simons EJ, van Doeselaar M, Tesei S, Antonini A, Canesi M, Zecchinelli A, Mariani C, Meucci N, Sacilotto G, Cilia R, Isaias IU, Bonetti A, Sironi F, Ricca S, Oostra BA, Bonifati V, Pezzoli G. LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: A clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample. *Parkinsonism Relat Disord*. 2006 Oct;12(7):410-9. Epub 2006 Jun 5.

Graybiel AM, Hirsch EC, Agid Y. The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 1990;53:17-29.

Haapaniemi TH, Pursiainen V, Korpelainen JT, Huikuri HV, Sotaniemi KA, Myllylä VV. Ambulatory ECG and analysis of heart rate variability in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Mar;70(3):305-10.

Haensch CA, Lerch H, Jörg J, Isenmann S. Cardiac denervation occurs independent of orthostatic hypotension and impaired heart rate variability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Feb;15(2):134-7.

Halliday GM, Del Tredici K, Braak H. Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006; (70):99-103

Hasegawa K, Stoessl AJ, Yokoyama T, Kowa H, Wszolek ZK, Yagishita S (Familial parkinsonism: study of original Sagamihara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15:300–306

Hayano J, Sakakibara Y, Yamada A, Yamada M, Mukai S, Fuhinami T, Fujinami T, Yokoyama K, Watanabe Y, Takata K. Accuracy of assessment of cardiac heart rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 1991;67: 199-204.

Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; 7:583–590.

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J.* 1996 Mar;17(3):354-81.

Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord.* 2005;20:190–199.

Henderson R, Kurlan R, Kersun JM, Como P. Preliminary examination of the comorbidity of anxiety and depression in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1992 Summer;4(3):257-64.

Hernandez D, Paisan Ruiz C, Crawley A et al. The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett* 2005; 389:137–139.

Hilz MJ, Dutsch M. Quantitative studies of autonomic function. *Muscle Nerve*. 2006;33:6–20.

Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967;17:427–442.

Hornykiewicz O. Imbalance of brain monoamines and clinical disorders. *Prog Brain Res*. 1982; 55:419-29

Houlden H, Singleton AB. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2012 Sep;124(3):325-38.

Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1993;50:140–148.

Huikuri HV. Heart rate variability in coronary artery disease. *J Int Med* 1995;237: 349-357

Iijima M, Osawa M, Momose M, Kobayakawa T, Saito S, Iwata M, Uchiyama S. Cardiac sympathetic degeneration correlates with olfactory function in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010 Jul 15;25(9):1143-9.

Imholz BP, van Montfrans GA, Settels JJ, et al. Continuous non-invasive blood pressure monitoring: reliability of Finapres device during the Valsalva manoeuvre. *Cardiovasc Res*. 1988;22:390–397.

Imrich R, Eldadah Ba, Benth O, Pechnik S, Sharabi Y, Holmes C, Goldstein Ds. Attenuated pre-ejection period response to tyramine in patients with cardiac sympathetic denervation. *Ann NY Acad Sci* 2008 Dec; 1148:486-9.

Ishihara L, Warren L, Gibson R, et al. Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Arch Neurol.* 2006 Sep;63(9):1250-4.

Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H, Takashima H, Satoh A, Seto M, Tsujihata M, Takahashi H. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology.* 1999 Apr 12;52(6):1269-71.

Jain S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 Feb;17(2):77-83.

Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2007;21(8):677-92.

Jellinger K. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792(7):730-40.

Jellinger K. Overview of morphological changes in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1987; 1-18

Jenner P, Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology.* 2006; 66(10 S4):S24-36

Kachergus J, Mata IF, Hulihan M et al. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005;76:672-680

Kallio M, Haapaniemi T, Turkka J, Suominen K, Tolonen U, Sotaniemi K, Heikkilä VP, Myllylä V. Heart rate variability in patients with untreated Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2000 Nov;7(6):667-72.

Kallio M, Suominen K, Bianchi AM, Mäkikallio T, Haapaniemi T, Astafiev S, Sotaniemi KA, Myllylä VV, Tolonen U. Comparison of heart rate variability analysis methods in patients with Parkinson's disease. *Med Biol Eng Comput.* 2002 Jul;40(4):408-14.

Kang P, Kloke J, Jain S. Olfactory dysfunction and parasympathetic dysautonomia in Parkinson's disease. *Clin Auton Res.* 2012 Aug;22(4):161-6.

Karemaker JM, Wesseling KH. Variability in cardiovascular control: the baroreflex reconsidered. *Cardiovasc Eng (Dordrecht, Netherlands)* Mar 2008;8(1):23–9 Jain S, Goldstein DS. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis. *Neurobiol Dis.* 2012 Jun;46(3):572-80.

Kerr GK, Worringham CJ, Cole MH, Lacherez PF, Wood JM, Silburn PA. Predictors of future falls in Parkinson disease. *Neurology.* 2010 Jul 13;75(2):116-24.

Khan NL, Jain S, Lynch JM, et al. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain.* 2005 Dec;128(Pt 12):2786-96.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605–608

Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Mar;2(3):136-46.

Korpelainen JT, Sotaniemi KA, Huikuri HV, Myllylä VV. Abnormal heart rate variability as a manifestation of autonomic dysfunction in hemispheric brain infarction. *Stroke* 1996;27:2059-2063.

Korpelainen JT, Sotaniemi KA, Mäkikallio A, Huikuri HV, Myllylä VV. Dynamic behaviour of heart rate in ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 1008-1013

Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology* 1999;52:302-8.

Lahrman H, Cortelli P, Hilz M, Mathias CJ, Struhal W, Tassinari M. EFNS guidelines on the diagnosis and management of orthostatic hypotension. *Eur J Neurol* Sep 2006;13(9):930–6.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):979-80.

Lesage S, Durr A, Tazir M et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006; 354:422–423

Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, Schjeide BM, et al Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002548.

Lim SY, Fox SH, Lang AE. Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2009 Feb;66(2):167-72.

Liou LM, Ruge D, Chang YP, Wu MN, Hsu CY, Lin CW, Tsai CL, Lai CL. Functional connectivity between lateral premotor-parietal circuits and the cardiac autonomic system in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2013 Mar 15;326(1-2):48-52.

Liu KD, Shan DE, Kuo TB, Yang CC. The effects of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus on heart rate variability in patients with Parkinson's disease. *J Neurol*. 2013 Feb 5.

Low PA, Denq JC, Opfer-Gehrking TL, et al. Effect of age and gender on sudomotor and cardiovagal function and blood pressure response to tilt in normal subjects. *Muscle Nerve*. 1997;20:1561–1568.

Low PA. Laboratory evaluation of autonomic function. In: Low PA, ed. *Clinical Autonomic Disorders*. 2nd edition. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997:179–295.

Lowe J, Lennox G, Leugh PN. Disorders of movement and system degenerations. In: Graham DI & Lantos P (eds) *Greenfields neuropathology* 6 th edition. E Arnold, London, 1997; 280-366

Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, Fonzo AD, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Rohe CF, Breedveld GJ, Hattori N, Gasser T, Oostra BA, Bonifati V. The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005 Dec;11(8):521-2.

Malik M, Farrell T, Cripps TR, Camm AJ. Heart rate variability in relation to prognosis after myocardial infarction: selection of optimal processing techniques. *Eur Heart J* 1989;10: 1060-1074

Marongiu R, Ghezzi D, Ialongo T, Soleti F, Elia A, Cavone S, Albanese A, Altavista MC, Barone P, Brusa L, Cortelli P, Petrozzi L, Scaglione C, Stanzione P, Tinazzi M, Zeviani M, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Valente EM, Garavaglia B; Italian PD Study Group. Frequency and phenotypes of LRRK2 G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006 Aug;21(8):1232-5.

Marras C, Schüle B, Munhoz RP, Rogaeva E, Langston JW, Kasten M, Meaney C, Klein C, Wadia PM, Lim SY, Chuang RS, Zadikof C, Steeves T, Prakash KM, de Bie RM, Adeli G, Thomsen T, Johansen KK, Teive HA, Asante A, Reginold W, Lang AE. Phenotype in

parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology*. 2011 Jul 26;77(4):325-33

Marsden CD, Olanow CW. The causes of Parkinson's disease are being unraveled and rational neuroprotective therapy is close to reality. *Ann Neurol*. 1998; 44(3 Suppl 1):S189-96

Marsden CD, Parkes JD. "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. *Lancet*. 1976; 292-6

Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Abe K, Bhattacharyya KB, Bloem BR, Carod-Artal FJ, Prakash R, Esselink RA, Falup-Pecurariu C, Gallardo M, Mir P, Naidu Y, Nicoletti A, Sethi K, Tsuboi Y, van Hilten JJ, Visser M, Zappia M, Chaudhuri KR. International study on the psychometric attributes of the non-motor symptoms scale in Parkinson disease. *Neurology*. 2009 Nov 10;73(19):1584-91.

Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Kurtis MM, Chaudhuri KR. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011;26:399-406.

Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Kurtis MM, Chaudhuri KR; NMSS Validation Group. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011 Feb 15;26(3):399-406.

Mastrocola C, Vanacore N, Giovani A, Locuratolo N, Vella C, Alessandri A, Baratta L, Tubani L, Meco G. Twenty-four-hour heart rate variability to assess autonomic function in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 1999 Apr;99(4):245-7.

Mathias CJ. Autonomic diseases: management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(Suppl 3):42-7.

Mayeux R, Marder K, Cote LJ, Denaro J, Hemenegildo N, Mejia H, et al. The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988–1993. *Am J Epidemiol* 1995;142:820-7.

Meco G, Vanacore N, Locuratolo N, Bonifati V V, Vella C, Giovani A, Tubani L, Baratta L, Mastrocola C. Heart rate variability in Parkinson's disease patients treated with tolcapone. *Parkinsonism Relat Disord*. 2000 Oct 1;6(4):223-227.

Mihci E, Kardelen F, Dora B, Balkan S. Orthostatic heart rate variability analysis in idiopathic Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2006 May;113(5):288-93.

Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clin Neurosci Res*. 2006;6:261–281.

Myllylä VV, Korpelainen JT, Tolonen U, Havanka H, Saari A. Neuropathology and cardiovascular regulation. In: GJ Ter Horst (ed) *The nervous system and the heart*. Human Press Inc. Totowa, NJ, 2000; 181-237.

Nakamura T, Hirayama M, Hara T, Hama T, Watanabe H, Sobue G. Does cardiovascular autonomic dysfunction contribute to fatigue in Parkinson's disease? *Mov Disord*. 2011 Aug 15;26(10):1869-74.

Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, Paisan-Ruiz C, Jain S, Halter CA, Michaels VE, Reed T, Rudolph A, Shults CW, Singleton A, Foroud T; Parkinson Study Group-PROGENI investigators. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2005 Jan 29-Feb 4;365(9457):410-2.

Nakamura T, Hirayama M, Yamashita F, Uchida K, Hama T, Watanabe H, Sobue G. Lowered sympathetic nerve performance in response to exercise in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010 Jul 15; 25 (9):1183-9.

Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, Imanishi J. Circadian rhythm of rest activity and autonomic nervous system activity at different stages in Parkinson's disease. *Auton Neurosci*. 2011 Dec 7;165(2):195-200.

O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov. Disord*. 2008; 23(1):101–6.

Oka H, Toyoda C, Yogo M, Mochio S. Olfactory dysfunction and cardiovascular dysautonomia in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2010 Jun;257(6):969-76.

Omboni S, Parati G, Di Rienzo M, Wieling W, Mancia G. Blood pressure and heart rate variability in autonomic disorders: a critical review. *Clin Auton Res* 1996;6: 171-182

Oppenheimer DR. Lateral horn cells in progressive autonomic failure. *J Neurol Sci* 1980;46:393-404

Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006; 354:424–425

Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009; 65:19–23.

Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. Cloning of the gene

containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):595-600.

Palma JA, Urrestarazu E, Alegre M, Pastor MA, Valencia M, Artieda J, Iriarte J. Cardiac autonomic impairment during sleep is linked with disease severity in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol*. 2013 Jan 29.

Papapetropoulos S, Argyriou AA, Chroni E. No correlation between the clinical severity of autonomic symptoms (SCOPA-AUT) and electrophysiological test abnormalities in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21:430–431

Piha SJ. Cardiovascular autonomic function tests. Responses in healthy subjects and social insurance institution, ML:85, 1988; Finland

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.

Punia S, Behari M, Govindappa ST, Swaminath PV, Jayaram S, Goyal V, Muthane UB, Juyal RC, Thelma BK. Absence/rarity of commonly reported LRRK2 mutations in Indian Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 2006 Dec 1;409(2):83-8.

Pursiainen V, Haapaniemi TH, Korpelainen JT, Huikuri HV, Sotaniemi KA, Myllylä VV. Circadian heart rate variability in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2002 Nov;249(11):1535-40.

Quadri M, Cossu G, Saddi V, Simons EJ, Murgia D, Melis M, Ticca A, Oostra BA, Bonifati V. Broadening the phenotype of TARDBP mutations: the TARDBP Ala382Thr mutation and Parkinson's disease in Sardinia. *Neurogenetics*. 2011 Aug;12(3):203-9.

Quattrone A, Bagnato A, Annesi G, Novellino F, Morgante L, Savettieri G, et al. Myocardial 123metaiodobenzylguanidine uptake in genetic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23:21–27.

Rahman F, Pechnik S, Gross D, Sewell L, Goldstein DS. Low frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Clin Auton Res.* 2011 Jun;21(3):133-41.

Rajput A, Dickson DW, Robinson CA, Ross OA, Dachsel JC, Lincoln SJ, Cobb SA, Rajput ML, Farrer MJ. Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology.* 2006 Oct 24;67(8):1506-8.

Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations. *Nat Genet* 2006; 38:1184–1191

Ravits JM. Autonomic nervous system testing. *Muscle Nerve* 1997; 20: 919-937

Rodríguez M, Sabaté M, Troncoso E. Time and frequency domain analysis for the assessment of heart autonomic control in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 1996;103(4):447-54.

Ruffmann C, Giaccone G, Canesi M, Bramerio M, Goldwurm S, Gambacorta M, Rossi G, Tagliavini F, Pezzoli G. Atypical tauopathy in a patient with LRRK2-G2019S mutation and tremor-dominant Parkinsonism. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012 Jun;38(4):382-6.

Sauvageot N, Vaillant M, Diederich NJ. Reduced sympathetically driven heart rate variability during sleep in Parkinson's disease: a case-control polysomnography-based study. *Mov Disord.* 2011 Feb 1;26(2):234-40.

Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain.* 2000 Nov;123 ( Pt 11):2297-305.

Sénard JM, Verwaerde P, Rascol O, Montastruc JL. Effects of acute levodopa administration on blood pressure and heart variability in never treated parkinsonians. *Hypertens Res.* 1995 Jun;18 Suppl 1:S175-7.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J et al. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302:841.

Sriranjini SJ, Ganesan M, Datta K, Pal PK, Sathyaprabha TN. Effect of a single dose of standard levodopa on cardiac autonomic function in Parkinson's disease. *Neurol India.* 2011 Sep-Oct;59(5):659-63.

Suárez-Moro R, Castaño-García B. Cardiovascular disorders in Parkinson's disease *Rev Neurol.* 2010 Feb 8;50 Suppl 2:S59-63

Tan EK, Skipper L, Chua E, Wong MC, Pavanni R, Bonnard C, Kolatkar P, Liu JJ. Analysis of 14 LRRK2 mutations in Parkinson's plus syndromes and late-onset. *Parkinson's disease. Mov Disord.* 2006 Jul;21(7):997-1001.

Thomas M, Hayflick SJ, Jankovic J. Clinical heterogeneity of neurodegeneration with brain iron accumulation (Hallervorden-Spatz syndrome) and pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Mov Disord* 2004; 19:36–42

Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010 Nov 15;25(15):2649-53.

Trachani E, Constantoyannis C, Sakellaropoulos GC, Stavrinou ML, Nikiforidis G, Chroni E. Heart rate variability in Parkinson's disease unaffected by deep brain stimulation. *Acta Neurol Scand.* 2012 Jul;126(1):56-61.

Turkka JT, Tolonen U, Myllylä VV. Cardiovascular reflexes in Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 1987;26(2):104-12.

Valappil RA, Black JE, Broderick MJ, Carrillo O, Frenette E, Sullivan SS, Goldman SM, Tanner CM, Langston JW. Exploring the electrocardiogram as a potential tool to screen for premotor Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010 Oct 30;25(14):2296-303.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004;304:1158–1160.

Valko PO, Hauser S, Werth E, Waldvogel D, Baumann CR. Heart rate variability in patients with idiopathic Parkinson's disease with and without obstructive sleep apnea syndrome. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 Jun;18(5):525-31.

Valdeoriola F, Gaig C, Muxí A, Navales I, Paredes P, Lomeña F, De la Cerda A, Buongiorno M, Ezquerro M, Santacruz P, Martí MJ, Tolosa E. 123I-MIBG cardiac uptake and smell identification in parkinsonian patients with LRRK2 mutations. *J Neurol.* 2011 ;258(6):1126-32

van Dijk JG, Haan J, Zwinderman K, Kremer B, van Hilten BJ, Roos RA. Autonomic nervous system dysfunction in Parkinson's disease: relationships with age, medication, duration, and severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993 Oct;56(10):1090-5.

Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology.* 2007; 69: 333–341

Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89:162–167

Weimer LH. Autonomic testing. In: Diagnostic Testing in Neurology. In: Evans R, ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 1999:337–365.

Weintraub D, Koester J, Potenza MN, Siderowf AD, Stacy M, Voon V, Whetteckey J, Wunderlich GR, Lang AE. Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Arch Neurol.* 2010 May;67(5):589-95.

West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 15;102(46):16842-7.

Whaley NR, Uitti RJ, Dickson DW, Farrer MJ, Wszolek ZK. Clinical and pathologic features of families with LRRK2-associated Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006;(70):221-9.

Wolters ECh. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15 Suppl 3:S6-12

Woo MA, Stevenson WG, Moser DK, Middlekauff HR. Complex heart rate variability and serum norepinephrine levels in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1994; 1; 23: 565-569.

Zhou B, Westaway SK, Levinson B, Johnson MA, Gitschier J, Hayflick SJ. A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat Genet* 2001; 28:345–349.

Ziegler D, Dannehl K, Mühlen H, et al. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses at various stages of diabetic neuropathy. *Diabet Med.* 1992a;9:806–814.

Ziegler D, Dannehl K, Volksw D, Mühlen H, Spüler M, Gries FA. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis and standard tests of heart-rate variation in newly diagnosed IDDM patients. *Diabetes Care*. 1992 Jul;15(7):908-11.

Ziegler D, Laux G, Dannehl K, et al. Assessment of cardiovascular autonomic function: age-related normal ranges and reproducibility of spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses. *Diabet Med*. 1992b;9:166–175.

Ziemssen T, Reichmann H. Cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2010 Feb 15;289(1-2):74-80.

Zimprich A, Benet-Pages A, Struhal W et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89:168–175

Zimprich A, Biskup S, Leitner P et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44:601–607