



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

in Neuroscienze

Ciclo XXXII

**La biopsia di cute nella diagnosi delle sinucleinopatie: specificità
della metodica nella popolazione anziana**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza
Area 06- Scienze Mediche MED/26 Neurologia

Presentata da:	Dott.ssa Laura Fadda
Coordinatore Dottorato:	Prof.ssa Paola Fadda
Tutor:	Prof. Giovanni Defazio

Esame finale anno accademico 2018-2019
Tesi discussa nella sessione d'esame Gennaio-Febbraio 2020

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1. Le Sinucleinopatie

1.2. Neuropatologia delle Sinucleinopatie

1.2.1. Sistema nervoso Centrale

1.2.2. Sistema nervoso Periferico

1.3. Malattia a corpi di Lewy incidentale

1.3.1 Definizione

1.3.2 Epidemiologia

1.3.3 Significato fisiopatologico

1.4. La biopsia di cute per la diagnosi delle Sinucleinopatie

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione in studio

3.2. Metodologia di prelievo e analisi del campione bioptico

4. RISULTATI

5. DISCUSSIONE

6. CONCLUSIONI

7. BIBLIOGRAFIA

ABBREVIAZIONI

AD: malattia di Alzheimer;

DAT: trasportatore della dopamina;

DLB: demenza con corpi di Lewy;

DMX: nucleo motore dorsale del vago;

ILBD: malattia a corpi di Lewy incidentale;

LBS: corpi di Lewy;

LC: locus coeruleus;

LNs: neuriti di Lewy;

MSA: atrofia multisistemica;

NBM: nucleo basale di Meynert;

NFT: grovigli neuro fibrillari di proteina Tau;

P- α -sin: fosfo- α -sinucleina;

PAF: pure autonomic failure

PD: malattia di Parkinson;

PDD: malattia di Parkinson - demenza;

RBD : disturbo comportamentale in sonno REM;

SN: sostanza nera;

SNA: sistema nervoso autonomo;

SNC: sistema nervoso centrale;

SNP: sistema nervoso periferico;

SNE: sistema nervoso enterico;

SNpc: sostanza nera pars compacta;

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Sinucleinopatie

Nel 1817 James Parkinson pubblicò uno studio a lungo termine su sei pazienti che presentavano un quadro clinico dominato da bradicinesia, tremore e rigidità [1]; a tale condizione morbosa diede il nome di “Paralisi agitante”. Quaranta anni dopo, Charcot, ribattezzò la patologia “Malattia di Parkinson” (PD). Per lungo tempo il PD è stato considerato un disturbo squisitamente motorio e ancora oggi, malgrado sia ampiamente riconosciuta la concomitante, e talora più precoce, presenza di un vasto corollario di altri sintomi, sulle manifestazioni motorie si fonda la diagnosi di tale malattia. La sintomatologia motoria del PD è riassunta dalla classica triade di bradicinesia, tremore a riposo e rigidità, in associazione a instabilità posturale, ipomimia, ipofonia e micrografia. Tra i sintomi non-motori del PD si riconoscono l’iposmia, la compromissione cognitiva, i sintomi psichiatrici, i disturbi del sonno, la disfunzione autonoma, il dolore e la fatica. Il contributo della genetica nel determinare il rischio di PD è suggerito dall’ evidenza di un aumentato rischio di malattia negli individui con storia familiare positiva, e dalla identificazione di forme monogeniche di PD, quali quelle associate a mutazione dei geni SNCA, LRRK2, parkina. [2,3]

Nelle fasi avanzate di malattia sono frequenti anche i sintomi non-motori, in particolare quelli associati a disfunzione autonoma quali l’incontinenza urinaria, la costipazione, e l’ipotensione ortostatica sintomatica [4,5]. Nell’83% dei pazienti con storia di malattia da almeno 20 anni si osserva, inoltre, demenza [5]. La compromissione cognitiva è parte integrante della fenomenologia clinica del PD e si è stimato che l’incidenza di demenza in questi pazienti sia circa quattro volte superiore a quella della popolazione generale [6]. Va inoltre precisato che un certo grado di deterioramento cognitivo (non sufficiente a raggiungere la soglia della demenza) può essere presente precocemente nel corso della malattia, con deficit cognitivi presenti in circa il 24% dei pazienti al momento della diagnosi di PD [7]. La demenza, quando presente, incide in maniera sostanziale nella prognosi e nella qualità della vita del paziente affetto da PD [8], così da configurare quasi una forma di malattia parzialmente distinta dal comune PD, e genericamente identificato come Malattia di Parkinson - Demenza (PDD) [9]. Caratteristica del PDD, quantomeno per quanto concerne la fenomenologia cognitiva, è la comparsa inizialmente di sintomi motori (da qui la diagnosi di PD) e successivamente di Demenza (pertanto PDD).

Tuttavia, lo spettro delle sinucleinopatie appare ulteriormente complicato dall'esistenza di un'altra entità clinica, caratterizzata da sintomi motori simili a quelli del PD (e definiti genericamente come "parkinsonismo") ma in cui la demenza rappresenta il sintomo principale e più precoce. Tale condizione clinica viene designata Demenza a Corpi di Lewy (DLB) [10], ed inserita nello spettro delle sinucleinopatie per le radici neuropatologiche e molecolari comuni anche a PD e PDD. PD, PDD e DLB, come entità nosograficamente distinte, pongono non pochi problemi sia dal punto di vista della interpretazione del processo patologico sottostante le sinucleinopatie, sia dal punto di vista della diagnostica differenziale. In particolare, la distinzione clinica tra PDD e DLB rappresenta il principale nodo interpretativo, che fino ad oggi si è stabilito di risolvere facendo appello ad un criterio temporale: quando il disturbo motorio (parkinsonismo) compare prima (almeno di un anno) della demenza si parla di PDD, viceversa, se a comparire è prima la demenza, eventualmente associata al parkinsonismo dall'esordio, si parla di DLB [11,12].

Fin dalle prime descrizioni la DLB si presentava dal punto di vista clinico come una forma di demenza con caratteristiche differenti rispetto alla M. di Alzheimer o alla demenza vascolare, non solo per il profilo cognitivo caratterizzato dal prominente deficit delle funzioni visuo-spaziali ed esecutive, ma per la presenza di un ricco corteo sintomatologico caratterizzato dalla presenza di allucinazioni visive, fluttuazioni dello stato di coscienza, e il già citato parkinsonismo. Inoltre, nei pazienti con DLB, è stata descritta frequentemente una discreta sensibilità ai farmaci neurolettici, nonché, in comune con le altre sinucleinopatie, la presenza, anche in fase premorboza, di RBD. [12].

A completare lo spettro delle sinucleinopatie, l'Atrofia Multisistemica (MSA) rappresenta la più rara tra queste patologie, e si caratterizza per la presenza di parkinsonismo, segni e sintomi cerebellari, disfunzioni autonome e segni di interessamento della via corticospinale. [13]

La malattia in genere esordisce con sintomi da interessamento del sistema nervoso autonomo, in particolare disfunzioni vescicali e, nell'uomo, deficit erettili, [23] e a seguire compaiono sintomi e segni di interessamento del sistema cerebellare e/o extrapiramidale. In particolare, l'80% dei pazienti sviluppa prevalentemente un quadro motorio dominato dal parkinsonismo (MSA-P) e circa il 20% segni e sintomi cerebellari (MSA-C). Caratteristica dell'MSA è la progressione rapida di malattia con la comparsa di sintomi bulbari e precoce disequilibrio, mentre la maggior parte dei pazienti manifesta solo una forma lieve di deterioramento cognitivo, con disfunzioni di tipo fronto-sottocorticale. In comune con le altre sinucleinopatie, inoltre, anche nell'MSA si osservano alterazioni del sonno tipo RBD [24].

Nel 1997, a seguito della scoperta di una mutazione nel gene per l' α -sinucleina (SNCA) quale causa di PD familiare [14], la proteina da esso codificata –l' α -sinucleina appunto- veniva identificata come principale componente dei filamenti che costituiscono i corpi e i neuriti di Lewy [15]. Si trattava di inclusioni neuronali descritte negli encefali di pazienti affetti da PD e DLB, e presenti anche, seppur a localizzazione prevalentemente gliale, nell'MSA. Filamenti simili a quelli estratti dall'encefalo di pazienti vennero quindi per la prima volta prodotti in vitro utilizzando una α -sinucleina ricombinante [16,17].

α -sinucleina è un'abbondante proteina encefalica di 140 amminoacidi, membro di una famiglia di proteine cui fanno parte anche le β e γ - sinucleine [18]. Il nome sinucleina venne usato perchè la prima di queste proteine ad essere scoperta si trovava sia nel terminale sinaptico che nel rivestimento nucleare della cellula [19]. Nelle cellule nervose α -sinucleina è localizzata nella sinapsi dove è coinvolta nel traffico vescicolare, incluso quello delle proteine chaperon, nell'inibizione della fosfolipasi D2 e nella produzione di stress ossidativo. La proteina sembrerebbe infatti avere sia funzione neuroprotettiva che neurotossica [18].

α - sinucleina può essere fosforilata e nitrata ed è suscettibile di trasporto assoplasmatico [20]; in particolare si è visto che essa subisce una fosforilazione alla Serina 129 solo in certe condizioni patologiche [21].La proteina è inoltre capace, in condizioni ancora non del tutto chiarite, di andare incontro ad una modifica conformazionale della sua struttura terziaria: da una struttura fisiologica nativa ad α -elica, assume una struttura a foglietto- β , perdendo così le sue fisiologiche capacità di legame [18]. L' α -sinucleina così ripiegata presenta una elevata tendenza a formare aggregati e, unitamente ad altre molecole di α -sinucleina "misfolded", viene trasformata in inclusi insolubili fibrillari (Figura 1).Non è chiaro se la tossicità di α - sinucleina dipenda dagli aggregati fibrillari o dal processo stesso che ne determina la formazione, ma diverse osservazioni sembrano indicare che forme aggregate/oligomeriche di questa proteina siano responsabili della sua tossicità.

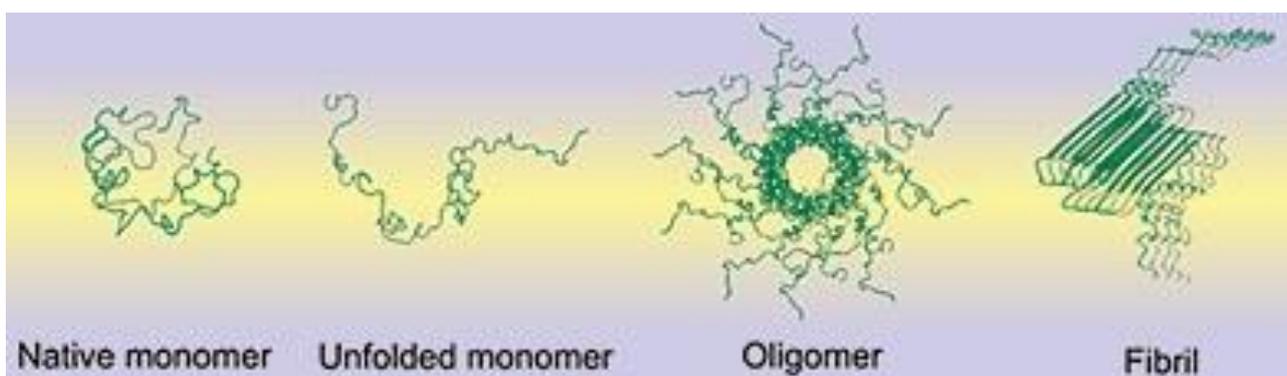


Figura 1: forme fisiologiche (*native monomer*) e patologiche di α -sinucleina

Molti dei fattori intrinseci ed estrinseci che contribuiscono all'induzione e al mantenimento del misfolding proteico e dell'aggregazione sono attualmente sconosciuti. Allo stesso modo, non è chiaro perché questi eventi si verificano solo in tipi cellulari predisposti e perché queste cellule nervose non eliminino il materiale proteico attraverso una rapida ubiquitinazione e successiva metabolizzazione da parte di proteosomi. Apparentemente, dopo l'aggregazione, i detriti non possono essere sottoposti ai fisiologici meccanismi di clearance cellulare e pertanto gli aggregati proteici persistono sotto forma di corpi inclusi nella cellula [22].

Le strutture nervose e gli assoni che contengono aggregati di α -sinucleina possono sopravvivere per anni. La sopravvivenza neuronale, tuttavia, non equivale all'integrità funzionale. La questione che è stata sollevata è se i neuriti di Lewy (LNs) e i corpi di Lewy (LBs) causino morte o disfunzione neuronale prematura, o se, al contrario, svolgano un ruolo protettivo o non-patogenetico nei confronti della cellula [23, 24]. E' tuttavia logico dedurre che oltre una certa soglia le inclusioni intraneuronali alla fine diventino dannose per la salute cellulare.

Negli ultimi anni è stato anche dimostrato che il misfolding di α -sinucleina possa diffondere alle cellule adiacenti in modalità simil-prionica, seguendo una via che, partendo dal tronco encefalico o persino dal nervo vago, potrebbe progredire in senso centripeto [25-27].

La diffusione da cellula a cellula di α -sinucleina potrebbe avvenire mediante il rilascio dalla cellula degli aggregati proteici, attraverso sinapsi o per via transmembrana dal corpo cellulare del neurone [28,29].

Se è stato, seppur in parte, descritto il ruolo che α -sinucleina potrebbe avere nelle malattie con inclusioni neuronali, ancor più complessa è la spiegazione della funzione di α -sinucleina nell'MSA, in cui l'accumulo proteico si verifica prevalentemente negli oligodendrociti, cellule in cui, in encefali normali, l' α -sinucleina non è stata mai riscontrata.

1.2 Neuropatologia delle Sinucleinopatie

1.2.1 Sistema Nervoso Centrale

Dal punto di vista istopatologico il PD si caratterizza per la presenza di inclusioni citoplasmatiche neuronali e neuriti distrofiche immunoreattive per α -sinucleina (rispettivamente LBs e LNs) in sottotipi di neuroni particolarmente vulnerabili ; a ciò si associa progressiva perdita neuronale.

Nel PD, le principali strutture coinvolte in tale processo sono la sostanza nera pars compacta del mesencefalo (SNpc), il locus coeruleus (LC), il nucleo basale di Meynert (NBM) e il nucleo motore dorsale del vago (DMX). Nella SNpc si osserva degenerazione di circa il 60-88% dei neuroni dopaminergici a proiezione striatale. La degenerazione cellulare prosegue nella via nigro-striatale determinando un progressivo danno dello striato, in particolare del putamen dorsale e caudale [30].

Nella fase precoce della malattia e in pazienti con storia recente di PD il numero di neuroni dopaminergici nello striato è aumentato, mentre tende a ridursi con il progredire della malattia [31]. Successivamente, le inclusioni di α -syn e la degenerazione neuronale nello striato tendono ad aumentare con il progredire della malattia [32]. La degenerazione nigro-striatale causa la denervazione dopaminergica dello striato, e i sintomi motori compaiono quando si raggiunge una perdita di circa 57-80% delle connessioni dopaminergiche striatali e del 56% del DAT (trasportatore della dopamina) [33]. E' pertanto sufficiente circa il 50% dell'innervazione dopaminergica striatale per una normale funzione motoria.

Dal punto di vista morfologico, i classici LBs si presentano come degli inclusi citoplasmatici sferici di circa 8-30 μ m di diametro, con un core ialino eosinofilo, delle lamelle concentriche e un cercine esterno. Figura 2

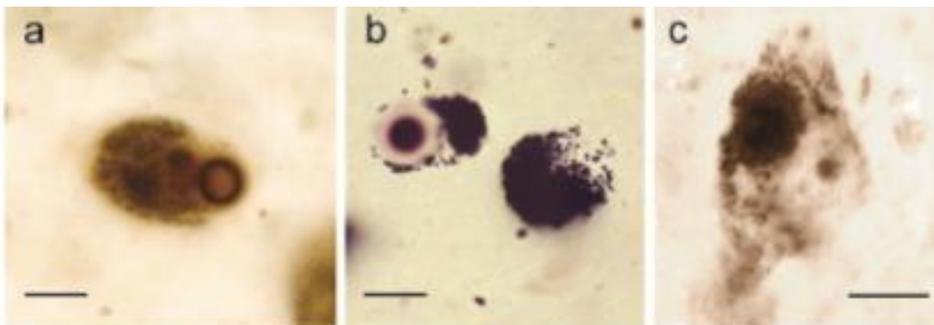


Figura 2: Lewy bodies intraneuronali visualizzati con Ab diretti contro ubiquitin (a) α -synuclein (c), e con tecnica argentea (Campbell-Switzer pyridin) (b)

I LBs corticali si distinguono dai classici LBs poiché privi di cercine esterno e più difficili da riconoscere alle colorazioni istologiche di routine. Sono presenti, in numero variabile, in quasi tutti i casi di PD [34]. Si osservano negli strati corticali della corteccia, in neuroni piccoli non piramidali, soprattutto a livello dell'insula, dell'amigdala, e dei giri paraippocampale e cingolato.

Nella DLB i LB classici sono generalmente localizzati nella SN e nel LC, ma spesso si presentano, specie nei casi con scarsa perdita neuronale, di modesta entità. A livello corticale, invece, i LB sono numericamente più consistenti. [12]

Sia nel PD che, soprattutto, nella DLB, è frequente il riscontro di alterazioni neuropatologiche tipiche dell'AD, come i grovigli neurofibrillari di tau e le placche di beta amiloide. [12,35]

È stato proposto un modello di stadiazione della patologia nel PD [36-38]. La patologia con LB potrebbe avere inizio nella parte inferiore del tronco encefalico, coinvolgendo il DMX, la zona reticolare intermedia e il nucleo olfattorio anteriore, lasciando integri il NBM e le regioni del mesencefalo (Stadio 1). Successivamente si avrebbe una diffusione caudale ai nuclei del rafe, al nucleo reticolare gigantocellulare e al complesso coeruleus-subcoeruleus (Stadio 2). Questi stadi iniziali sono considerati asintomatici o presintomatici e potrebbero spiegare la presenza e i sintomi precoci non motori (autonomici e olfattivi) che precedono in genere le disfunzioni somatomotorie nel PD. Nello stadio 3, il LC, il nucleo centrale dell'amigdala, i nuclei del prosencefalo basale, e la SNc posterolaterale e posteromediale sono la sede delle modificazioni citoscheletriche e della successiva perdita neuronale. Nello stadio 4, si arriva al coinvolgimento della corteccia limbica temporale anteromediale, della neocorteccia e dell'amigdala. Gli stadi 3 e 4 sono stati associati alla fase clinicamente sintomatica della malattia. Nella fase terminale (stadi 5 e 6), il processo patologico raggiunge la neocorteccia, in particolare le aree sensitive associative e quelle prefrontali inizialmente, e poi la corteccia sensitiva primaria e le aree motorie fino al coinvolgimento dell'intera neocorteccia.

A differenza del PD e della DLB, l'MSA si caratterizza, dal punto di vista istopatologico, per la presenza di inclusioni di α -sinucleina insolubile localizzati negli oligodendrociti, e, più raramente, nei neuroni e loro processi cellulari; a tale reperto si associa perdita neuronale, astrocitosi e deplezione di mielina. I reperti neuropatologici necessari per stabilire la diagnosi di MSA definita sono le inclusioni citoplasmatiche gliali di α -sinucleina e la neurodegenerazione nella SN e sistema olivopontocerebellare [39].

1.2.2 Sistema Nervoso Periferico

Gli inclusi contenenti α -sinucleina, i LB e i LN, sono stati identificati prevalentemente nel SNC di pazienti affetti da sinucleinopatie. Tuttavia, i medesimi reperti neuropatologici, o forme meno

complesse di aggregati di α -sinucleina, sono stati descritti in diversi tessuti extracerebrali sia in vivo che post-mortem [40].

Numerosi studi hanno indagato la presenza di depositi di α -sinucleina e della sua forma patologica, la fosfo- α -sinucleina (P- α -sinucleina) nel tratto gastrointestinale (esofago, stomaco, intestino) di pazienti affetti da PD.

Tra le prime descrizioni di depositi extracerebrali di α -sinucleina, figura la descrizione di inclusi tipo LB nelle cellule nervose dell'esofago di pazienti con PD affetti da disfagia, [41]. L'immunoreattività per α -sinucleina nell'esofago si presenta con una sensibilità variabile nei diversi studi, con un range che va dal 50-100% nei PD e dal 0-14% nei controlli [42,43]. La sensibilità e specificità della ricerca di immunoreattività per α -sinucleina è soggetta a discreta variabilità non solo in funzione della metodologia in uso ma anche della scelta di ricercare depositi della proteina nella sua forma fosforilata (P- α -sinucleina)rispetto alla non fosforilata.

Nel 2010 Beach e colleghi [44] hanno ricercato depositi di P- α -sinucleina in diversi tratti dell'apparato gastrointestinale di pazienti affetti da differenti sinucleinopatie; la maggiore incidenza di depositi immunoreattivi veniva riscontrata nell'esofago (33%) e nella ghiandola sottomandibolare (39%), seguivano lo stomaco (22%), il duodeno (17%), il digiuno (8%), l'ileo (17%), il colon (6%) e il retto (6%). La sensibilità dell'esame, nella popolazione dei pazienti con PD, raggiungeva il 93% quando venivano analizzate più sezioni (paraffina, 80 μ m) dell'esofago.

La mucosa/sottomucosa del colon-retto rappresentano le sedi maggiormente studiate, con numerosi studi che hanno indagato la presenza o meno di depositi di α -sinucleina in vivo. Anche in questo caso la ricerca di immunoreattività per la forma fosforilata di α -sinucleina ha consentito di ottenere una specificità del 100% (nessun deposito nel soggetto sano) e una sensibilità variabile dal 23% all'80% [45-50]. Tale variabilità è stata imputata ad un possibile gradiente rostro-caudale nella distribuzione dei depositi patologici, per cui la sensibilità del test risulterebbe maggiore nei tratti più prossimali dell'intestino rispetto a quelli più distali [45].

Anche nelle ghiandole salivari sono stati identificati, sia in vivo che post mortem, depositi patologici di P- α -sinucleina sia in pazienti affetti da PD che da DLB [51-53], mentre a livello della mucosa olfattoria i dati sono risultati talora contrastanti, con riscontro di positività anche in soggetti considerati di controllo [54].

Deposit di α -sinucleina e della sua forma fosforilata sono stati identificati, in cadaveri di soggetti affetti da PD o DLB,anche a livello dei gangli simpatici paravertebrali, nel miocardio e nelle fibre nervose intramiocardiche, nei gangli autonomici epicardici, nel nervo vago, specialmente nel tratto

più prossimale al tronco encefalico, a livello surrenalico , nelle strutture nervose circostanti il muscolo psoas e nella cute [55].

1.3 Malattia a corpi di Lewy incidentale

1.3.1 Definizione

Per la prima volta nel 1959 i LBs venivano descritti in una casistica autoptica di individui privi di patologia neurologica. [56]. I 206 soggetti sani reclutati nello studio rappresentavano il gruppo di controllo a confronto con pazienti affetti da parkinsonismo. I LBs, ai tempi non ancora routinariamente individuati mediante immunoistochimica, erano stati riscontrati nel 4,9% dei controlli sani. Gli autori segnalavano, inoltre, come le inclusioni neuronali fossero sempre assenti nei soggetti sani di età inferiore a 61 anni.

A distanza di 10 anni, nel 1969, Forno e colleghi descrivevano i LBs nell'encefalo di 50 individui privi di segni e sintomi di parkinsonismo. [56] Gli autori concludevano che tali reperti neuropatologici rappresentavano un riscontro "incidentale", pur essendo la distribuzione delle inclusioni cellulari del tutto simile a quella precedentemente descritta in pazienti affetti da PD. I soggetti con LBs incidentali erano tutti individui di età superiore a 62 anni. [57]

Con il termine di Malattia a corpi di Lewy incidentale (ILBD) si fa riferimento alla presenza di LBs e/o LNs nell'encefalo di individui anziani non affetti da parkinsonismo e/o demenza. [57-75]

La definizione di ILBD è resa più complessa dall'evidenza che i LBs possano essere riscontrati nell'encefalo di soggetti non affetti da parkinsonismo e/o demenza, ma con altre patologie neurologiche. In particolare i LBs sono stati descritti in alcune forme di PD giovanile [76], nell'atrofia olivo-ponto-cerebellare [77], nella malattia di Joseph [78], nella malattia di Hallervorden-Spatz [79], nell'atassia-teleangectasia [80], e in alcune forme sia genetiche che sporadiche di malattia del motoneurone [81]. In questi casi i LBs vengono riscontrati in soggetti di giovane età, nell'ambito di patologie spesso familiari, e si associano alla presenza di reperti neuropatologici aggiuntivi. Questi casi non sono considerati ILBD in quanto tale condizione presuppone che i LBs e i LNs rappresentino l'unico marker neuropatologico e che questi siano riscontrati in specifici tipi cellulari neuronali e in siti predisposti [82]. In particolare, nella ILBD i depositi di alfa-sinucleina sono localizzati negli stessi siti coinvolti nelle sinucleinopatie e pertanto la distinzione tra ILBD e PD/DLB non risiede nel reperto neuropatologico in sé ma nella sua

associazione o meno con un determinato quadro clinico. Questa comune radice neuropatologica (tra i ILBD e PD/DLB), unitamente all'assenza, nella ILBD, di un quadro clinico suggestivo di sinucleinopatia, ha posto in essere l'ipotesi che la ILBD possa rappresentare la fase preclinica del PD. [82] Pertanto, giacchè gli studi relativi alla progressione neuropatologica del PD hanno posto in rilievo il tronco encefalico (e in particolare il DMX, la zona reticolare intermedia e il nucleo olfattorio anteriore) quale sede più precocemente interessata dalla patologia [36-38], va da se che secondo la maggior parte degli Autori la definizione di ILBD richiede che i LBs siano necessariamente presenti in tali strutture. [65-66] Tale precisazione topografica assume particolare rilievo se si considera l'elevata incidenza di LBs in pazienti affetti da AD. I LBs sono così frequentemente associati alla patologia dell'AD che inizialmente si riteneva fosse l'AD la causa dei sintomi cognitivi di PD e DLB. [10,12,83] Inoltre, un'elevata densità di LBs è riscontrata nell'amigdala di un sottogruppo di pazienti affetti da AD, in assenza di LBs sottocorticali. [84] In questi casi però, l'assenza di LBs nelle strutture tronco encefaliche (Stadi 1-3 di Braak), unitamente alla presenza di ulteriori reperti neuropatologici (patologia tipica dell'AD) consente di escludere tali casi dalla definizione di ILBD.

1.3.2 Epidemiologia

I dati di prevalenza della ILBD nelle varie casistiche mostrano risultati estremamente eterogenei. I primi due studi condotti in era pre-immunoistochimica per alfa-sinucleina, riportavano una prevalenza della ILBD nelle casistiche autoptiche del 4,9% e del 4,7%. [56,57] Già da tali lavori emergeva un elemento distintivo della ILBD: la stretta correlazione con l'età. In entrambi i lavori infatti, i LBs venivano riscontrati esclusivamente nell'encefalo di individui sani ma di età superiore ai 61-62 anni. Gibb and Lees suggerivano, nel 1988, che la ILBD fosse un processo età-dipendente. [58] Nella loro casistica la prevalenza di ILBD nella quinta decade era di circa il 3,8%, nella sesta decade di circa il 4,7%, nella settima decade del 9,3% e nell'ottava decade del 12,8%. L'analisi di precedenti casistiche suggeriva un analogo andamento crescente della prevalenza di ILBD in relazione all'età, ma con dati di prevalenza inferiori, rispetto a quelli della loro casistica, per la quinta decade (1,8%) e con una tendenza alla riduzione della prevalenza nella nona decade (16,7%) rispetto all'ottava decade (18,2%). Figura 3.

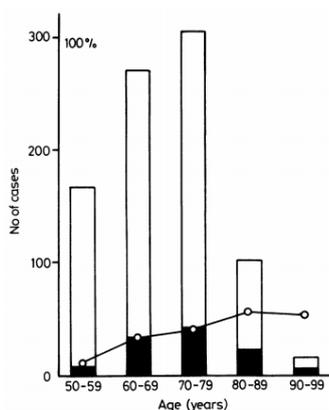


Figura 3: Prevalenza età relata di ILBD. Le colonne si riferiscono ai casi autoptici totali e la porzione evidenziata in nero si riferisce al numero di casi con riscontro di Lewy bodies. [58]

Relativamente alla localizzazione dei LBs nel nucleo motorio dorsale del nervo Vago (ipotizzata tra le sedi di più precoce coinvolgimento nel PD), la prevalenza di ILBD sembra seguire il medesimo andamento crescente con l'avanzare dell'età, con i valori maggiori osservati in ottava decade. [82]

In una casistica autoptica relativa alla popolazione africana anziana, la prevalenza della ILBD risulta del 5,3%. [59] Perry e colleghi, nel 1990, ipotizzavano che i dati sulla prevalenza della ILBD fossero influenzati dalla selezione del campione. Gli autori dimostravano come l'esclusione dei soggetti con patologia psichiatrica e/o deterioramento cognitivo dalle casistiche dei "controlli sani" determinasse una riduzione della prevalenza della ILBD dal 9% al 2,3%. [60] La prevalenza di LBs incidentali nella popolazione anziana con patologia psichiatrica risultava, nella medesima casistica, del 28%. [60]

Con l'introduzione delle tecniche di immunocistochemica per alfa-sinucleina si assiste ad un incremento della prevalenza dei casi di ILBD nelle casistiche autoptiche. In particolare, Tsuboi e colleghi riscontrano una prevalenza del 9,2% nei soggetti anziani sani [61], Parkkinen e colleghi descrivono LBs nell'11% dei soggetti in uno studio [62] e nel 13% in un altro [63] e Wakisaka e colleghi riscontrano una prevalenza di ILBD del 15%. [64]

Jellinger riporta dati di prevalenza della ILBD molto variabili: lo 0% in una casistica di 20 individui sani tra 78 e 84 anni [65], e il 30% in una casistica di 26 individui sani della medesima età. [66] La prevalenza di casi di ILBD è di 13% [67], 8,3% [68] e 24% [69] in tre studi prospettici di soggetti anziani cognitivamente integri. In uno studio epidemiologico finalizzato a valutare se soggetti con ILBD presentassero simile profilo di rischio dei pazienti PD, veniva riportata una prevalenza di ILBD nella casistica autoptica del 14,5%. [70] Più recenti casistiche hanno riportato dati di prevalenza della ILBD del 20% [71], 14,5% [72], 17% [73], 20% [74] e 33,6% [75].

1.3.3 Significato fisiopatologico

Fin dalle prime descrizioni di casi di ILBD, la forte similarità nella distribuzione dei LBs con quanto osservato nel PD, portò ad ipotizzare che la ILBD rappresentasse la fase preclinica del PD [57,58]. A ulteriore supporto della tesi vi sarebbe il riscontro di una disfunzione del sistema nigrostriatale nella ILBD, come dimostrato dai ridotti livelli di tirosina-idrossilasi (enzima responsabile della sintesi di dopamina) nello striato di soggetti con ILBD. [85] Quando confrontati con pazienti affetti da PD e con individui anziani sani privi di depositi encefalici di alfa sinucleina, i soggetti con ILBD mostrano una riduzione dei marcatori dopaminergici striatali (tirosina idrossilasi-TH e trasportatore vescicolare delle monoamine-VMAT2) di entità intermedia tra i PD e i sani. [86] Unitamente alla presenza di LBs, nella ILBD è stato riscontrato un certo grado di neurodegenerazione coinvolgente i neuroni della SN: anche in questo caso, la perdita neuronale che si osserva nella ILBD, peraltro indipendente dal carico di LBs, sarebbe di entità intermedia tra quanto si osserva nei controlli e nei PD. [87,88] L'assenza di manifestazioni cliniche neurologiche nei soggetti ILBD sarebbe quindi determinata dal limitato grado di neurodegenerazione che si osserva in tale condizione, piuttosto che dalla presenza di meccanismi secondari di compenso. [89] Va inoltre aggiunto il concetto che sintomi non motori precoci, e talora sfumati, come l'iposmia, seppur diffusamente presenti nella popolazione anziana, sono stati riscontrati con maggiore incidenza nei soggetti ILBD rispetto ai controlli. [90]

Nell'ipotesi che la ILBD rappresenti la fase preclinica del PD, ci si attende che la neuropatologia della ILBD sia in buona parte sovrapponibile a quella osservata nelle fasi più precoci del PD. Di fatto, come già precedentemente detto, i primi modelli di stadiazione dell PD facevano corrispondere la ILBD con lo stadio iniziale, encefalico, e ancora asintomatico, del PD stesso (stadi 1-3 di Braak). [25,82] Il fatto che, in alcuni casi di ILBD, si possa osservare una marcata estensione della patologia encefalica (stadi 5-6 di Braak) ha suggerito l'ipotesi che, in tali casi, la ILBD possa rappresentare la fase preclinica della DLB. [72]

La revisione della originaria stadiazione neuropatologica del PD ha introdotto il concetto che il PD potesse iniziare al di fuori del SNC, in particolare a livello del bulbo olfattorio e del sistema nervoso enterico. [91] Le evidenze di un coinvolgimento del SNP nelle patologie da alfa-sinucleina, e il concetto che la ILBD possa rappresentare la fase preclinica del PD, hanno inevitabilmente spinto verso la ricerca di una forma "periferica" di ILBD [92-107] Già in epoca pre stadiazione di Braak, nel 1999, Iwanaga e colleghi dimostravano la presenza di depositi di P- α -sin nei gangli simpatici stellato e toracico e nel plesso cardiaco di pazienti con ILBD. [92] Orimo e colleghi confermano

nella loro casistica autoptica la presenza di depositi di P- α -sin nei gangli simpatici, cui si associa una riduzione dell'innervazione a livello cardiaco. [93,94] Complessivamente gli autori riscontrano una degenerazione dell'innervazione simpatica cardiaca nel 50% dei soggetti con ILBD. Sorprendentemente, nessuno dei casi di ILBD presentava segni di degenerazione neuronale a livello centrale, portando pertanto gli autori a ipotizzare che la degenerazione dei nervi simpatici cardiaci preceda la perdita neuronale a livello centrale. [93] Meno chiaro è se la comparsa dei depositi di α -sin a livello dei nervi intramiocardici e dei gangli simpatici possa precedere la loro comparsa a livello encefalico, dato questo che viene riportato in un singolo case report di un giovane individuo asintomatico di 35 anni. [95] Nei soggetti ILBD si osserva una maggiore abbondanza di depositi di P- α -sin a livello degli assoni distali intramiocardici rispetto ai PD. Questo potrebbe essere imputabile alla maggiore degenerazione delle fibre nervose nel PD, con conseguente riduzione complessiva delle fibre nervose in cui è possibile riscontrare tali depositi. [94] Infatti, analogamente a quanto si osserva in encefalo, anche a livello periferico, in questo caso a livello cardiaco, la degenerazione neuronale osservata negli ILBD sarebbe di grado intermedio tra quanto si osserva nel PD e nei soggetti sani. [96] Tra gli ILBD, inoltre, i casi con maggiore degenerazione cellulare (definita dalla riduzione dell'immunoreattività per la tirosina idrossilasi-TH) presentano un minor numero di depositi di P- α -sin rispetto a quelli con minore degenerazione assonale. [94] L'entità dei depositi di α -sinucleina nelle fibre nervose dell'epicardio negli ILBD sembrerebbe aumentare proporzionalmente al progredire della patologia a livello centrale. [97] In vivo, depositi di P- α -sin sono stati riscontrati nelle fibre nervose del grasso epicardico di soggetti asintomatici per parkinsonismo sottoposti a chirurgia cardiaca. [98] I soggetti positivi per tali depositi (il 7,7% del campione) presentavano alcuni segni e sintomi compatibili con la fase prodromica di sinucleinopatia quali stipsi, disturbo di memoria, sospetta RBD; tuttavia ciò rende quantomeno opinabile il fatto di considerarli potenziali ILBD. Nello studio, inoltre, l'assenza di un'analisi del tessuto encefalico non consente di trarre delle conclusioni circa il significato da attribuire ai reperti riscontrati a livello cardiaco.

Bloch e colleghi descrivono, in soggetti con diagnosi di ILBD, depositi di α -sin nel midollo toraco/sacrale (100% dei casi); da segnalare che nel lavoro venivano utilizzate tecniche di immunoistochimica con anticorpi diretti contro α -sin nativa, e non specifici per la forma fosforilata. [99] Compatibilmente con tale limitazione, gli autori affermano che il pattern di distribuzione delle lesioni suggerisce come sede di esordio della patologia il tronco encefalico. [99] Gli aggregati di α -sin nativa a livello midollare sembrano prevalere, negli ILBD, a livello della colonna cellulare

intermediolaterale e talora nella porzione laterale delle corna anteriori e posteriori del midollo spinale, occasionalmente in prossimità del canale centrale. [100] Anche mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per la forma fosforilata di α -sinucleina è stata dimostrata la presenza di depositi della proteina nell' 83% degli ILBD, in particolare in corrispondenza dei nuclei autonomici soprattutto dei segmenti toracici [101]

Nella ghiandola sottomandibolare, depositi di α -sin e P- α -sin sono stati riscontrati, in soggetti con ILBD [102-104]; Depositi di P- α -sin vengono descritti, nella ILBD, anche negli assoni delle cellule dello strato ganglionare della retina. [105]

In soggetti con ILBD, LBs e LNs sono stati descritti nel sistema nervoso enterico dello stomaco ed esofago distale [99,104, 106, 107], nei gangli simpatici paravertebrali [92-95,99,102,107] nel nervo vago [99,102,107] e nel nervo sciatico [107].

Complessivamente, gli studi neuropatologici suggeriscono un coinvolgimento del Sistema Nervoso Periferico nella ILBD, supportando l'ipotesi che, laddove l'ILBD rappresenti la fase preclinica di PD/DLB, tali patologie potrebbero originare o interessare in tempi molto precoci i distretti nervosi extracerebrali.

L'ipotesi che la ILBD rappresenti la fase preclinica del PD/DLB pone alcuni problemi interpretativi. Quando riscontrata, a livello autoptico, la ILBD interessa una fascia di popolazione di età sovrapponibile all'età media dei pazienti con PD/DLB. Tuttavia, è verosimile che nella maggior parte dei PD/DLB l'esordio clinico sia avvenuto diversi anni prima, e che pertanto l'età di comparsa del parkinsonismo nella popolazione dei soggetti PD/DLB non abbia corrispondenza (poiché inferiore) con l'età dei soggetti ILBD. [87] Si è ipotizzato che la ILBD rappresenti una variante di sinucleinopatia a lenta degenerazione, per cui i soggetti in cui viene riscontrata autopticamente potrebbero non aver vissuto sufficientemente a lungo per poter raggiungere la soglia di comparsa delle manifestazioni cliniche. [89,96] In alternativa la ILBD potrebbe essere il prodotto di un processo patologico che si è autolimitato [96] o che esso rappresenti uno stato di "asintomaticità" garantito dalla presenza di fattori di protezione non ancora noti. [89] In ultimo, la ILBD potrebbe rappresentare un processo degenerativo aspecifico correlato all'invecchiamento, analogamente a quanto si osserva relativamente ai depositi encefalici di proteina Tau nell'anziano. [108-109]

1.4 La biopsia di cute per la diagnosi delle Sinucleinopatie

L'interessamento del sistema nervoso periferico nelle Malattie con corpi di Lewy ha offerto la possibilità di ottimizzare nuove metodologie diagnostiche basate sulla ricerca di depositi patologici di P- α -sinucleina nelle terminazioni nervose periferiche.

Tra le sedi extracerebrali oggetto di ricerca di depositi patologici di α -sinucleina, la cute ha rappresentato, sin dai primi studi autoptici, un sito interessante e di facile prelievo. Se si considera che i depositi extracerebrali di α -sinucleina sono stati riscontrati in tutti i tessuti ricchi di innervazione periferica autonoma, è evidente il vantaggio offerto da un tessuto come la cute, il quale, oltre ad essere riccamente innervato di fibre autonome destinate agli annessi (ghiandole e muscoli orripilatori) e alle strutture vascolari, risulta anche di facile accessibilità.

Negli studi autoptici, l'analisi della cute di soggetti affetti da sinucleinopatia (confermata dall'analisi dell'encefalo) mostra risultati abbastanza eterogenei, con specificità del 100% in tutti e una sensibilità variabile dallo 0% [107, 112] al 70% [111] e 100% [113]. Due di questi studi impiegano anticorpi diretti contro la forma fosforilata di α -sinucleina. [107,111] Complessivamente, dal confronto tra questi quattro studi emerge una maggiore sensibilità della metodica quando gli anticorpi utilizzati sono diretti contro P- α -sinucleina e quando il rilievo di tali depositi è affidato alla microscopia a fluorescenza [111,113] rispetto alla microscopia ottica [107,112].

In vivo, quattordici diversi studi hanno valutato la presenza di depositi di α -sinucleina o della sua variante fosforilata nelle terminazioni nervose della cute di soggetti affetti da sinucleinopatia. [114-1 28] Anche in questo caso, l'eterogeneità dei risultati, relativamente alla sensibilità della metodica, può essere attribuita alle differenti metodologie adottate, nonché alla patologia in studio (PD, DLB, MSA, pure autonomic failure_PAF).

Relativamente agli studi sui pazienti affetti da PD, la specificità della biopsia di cute si è rivelata elevata in tutti gli studi, mentre sono variabili i dati di sensibilità. Due studi hanno evidenziato la presenza di depositi di α -sin/P- α -sin solo nel 5,2-10% dei casi, analizzando la cute della regione toracica e della gamba [114,119], uno studio ha evidenziato analoghi depositi nel 52% dei pazienti utilizzando la cute delle dita, porzione prossimale e distale della gamba e dorso [115], uno studio condotto sulla cute della gamba (prossimale e distale) e del dorso mostra una sensibilità del 67% [117], uno studio mostra una sensibilità del 90% con multipli prelievi su gamba e coscia e a livello dell'avambraccio, e infine P- α -sin è riscontrata nel 100% dei pazienti su campioni biotici dell'avambraccio [118] di gamba e coscia [120] e della regione cervicale [116,123-125].

Nell'ipotesi di una distribuzione dei depositi lunghezza-dipendente, alcuni studi hanno valutato la presenza di un gradiente prossimo-distale: i depositi di P- α -sin sono stati riscontrati nel 100% dei pazienti con prelievo effettuato a livello cervicale, nel 52-75% con prelievo a livello della coscia e nel 24-31% dei casi con prelievo alla gamba. [116-123]

Nell'MSA, depositi di P- α -sin sono stati riscontrati nel 67% dei casi in uno studio con campionamento bioptico della cute del dorso, coscia e gamba [117] e nello 0% dei casi in due studi con campionamento bioptico della cute nella regione dell'avambraccio [118] o in due diversi siti, il torace e la gamba [119].

Deposit di P- α -sin sono stati infine riscontrati nel 100% dei pazienti affetti da PAF [123,124] e nel 100% dei pazienti affetti da DLB [125]; in tutti i casi, il prelievo di cute è stato eseguito in sede cervicale, nella coscia e nella gamba.

Nei pazienti con disturbo del comportamento nel sonno REM (RBD), considerato fase preclinica di sinucleinopatia, depositi di P- α -sin sono stati riscontrati nel 56% dei casi, con prelievo a livello cervicale, toracico e di gamba e coscia [127] e nel 75% dei casi con prelievo cervicale e di gamba bilaterali [128].

Nel PD, DLB e PAF, i depositi patologici di α -sin sono localizzati nelle fibre autonome della cute [114-125] mentre nell'MSA sono prevalentemente localizzati nelle fibre amieliche somatosensoriali del plesso subepidermico [117].

La biopsia di cute viene eseguita in vivo utilizzando un dispositivo sterile chiamato Punch, che consente di prelevare un piccolo cilindro di tessuto di diametro variabile. (Figura 4) In genere, negli studi condotti, il diametro del punch è di 3mm, con l'eccezione di Autori che hanno utilizzato campioni di dimensioni superiori, di 5 mm [115,117,127] o 6 mm [114].

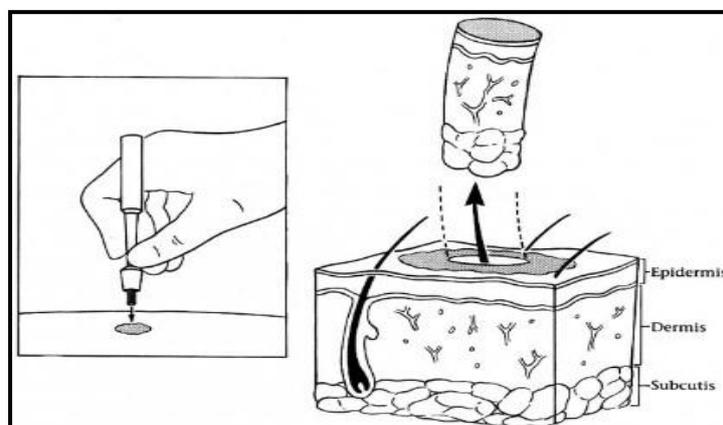


Figura 4: A sinistra, punch per il prelievo bioptico di cute. A destra, illustrazione del frammento di cute ottenuto con prelievo attraverso punch.

Le sezioni di cute sono in genere ottenute mediante taglio a fresco con criostato, di spessore variabile da studio a studio. [129] L'immunofluorescenza indiretta è la metodica più utilizzata, con doppia marcatura per i depositi patologici di α -sin e le strutture nervose. Per l'identificazione delle strutture nervose l'anticorpo più utilizzato è il PGP 9.5 (pan-neuronal marker protein gene product) che consente di identificare qualsiasi struttura nervosa, senza distinguerne specifici sottotipi (autonomica o somatica). Gli anticorpi primari sono quindi evidenziati utilizzando un anticorpo secondario fluorescinato che è visibile al microscopio a fluorescenza. (Figura 5) Alcuni studi hanno impiegato, viceversa, delle tecniche di immunistochemica con anticorpi diretti contro forme native o patologiche di α -sin, in assenza di una concomitante marcatura anche delle fibre nervose. [114,118,126]. Questa metodologia non consente di co-localizzare i depositi di α -sin e le strutture nervose, esponendo ad un maggiore rischio di incorretta interpretazione di reperti aspecifici.

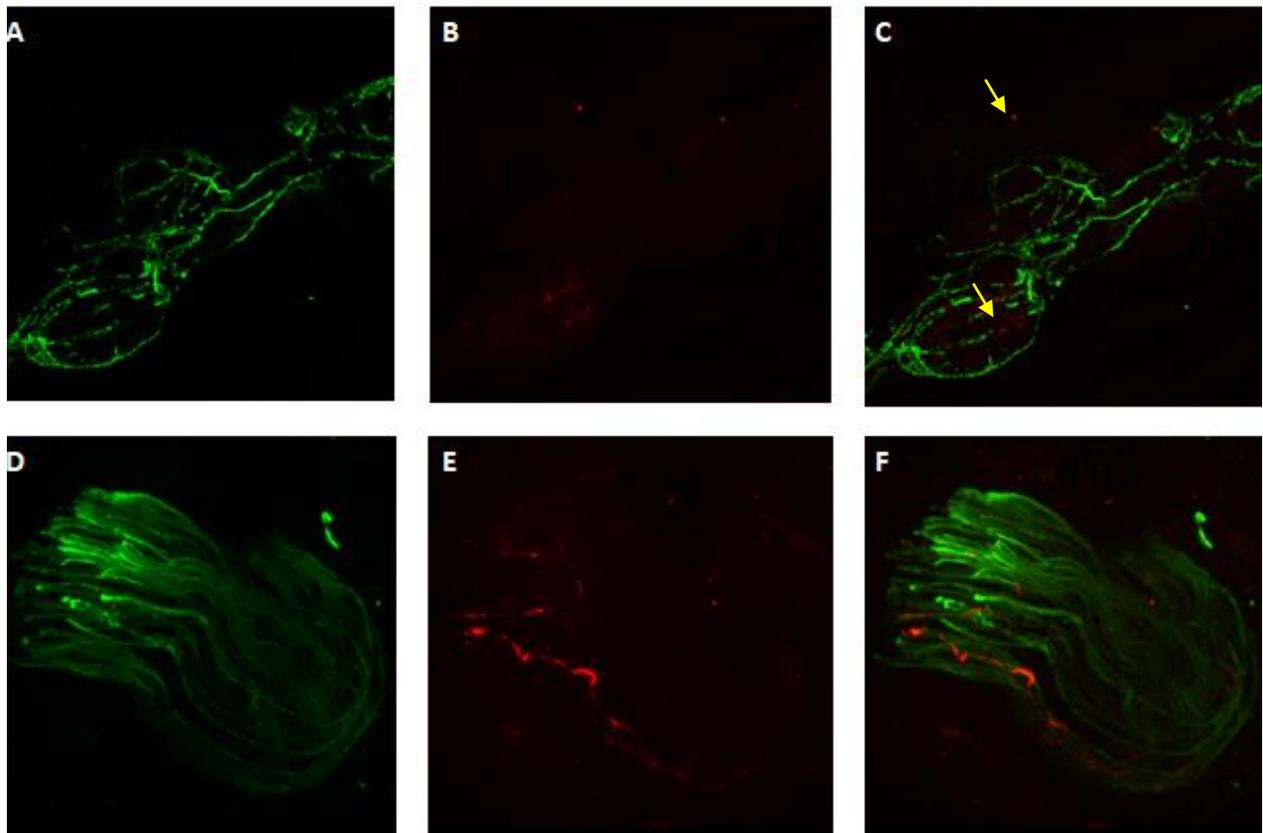


Figura 5: Analisi con immunofluorescenza indiretta di una sezione di cute di un controllo sano (A,B,C) e di un paziente affetto da PD (D,E,F). A e D: l'immunoreattività per PGP (verde). B e E: immunoreattività per P- α -si (rosso). C e F: il merge delle due immagini consente di visualizzare contemporaneamente l'immunoreattività per PGP e P- α -sin. In C, le frecce gialle indicano come la debole apparente positività per P- α -sin non co-localizzi con il PGP risultando pertanto aspecifica. In F, la positività per P- α -sin co-localizza con le fibre nervose positive per il PGP dimostrando pertanto una vera positività.

Lo spessore delle sezioni può variare da meno di 10 μm [114,118,126] fino a 50 μm [119,117,121] in funzione sia della tecnica utilizzata (paraffinato o sezioni a fresco) che delle scelte dei singoli laboratori. Complessivamente si può affermare che tanto più è spessa una sezione, tanto più il tessuto disponibile, tanto maggiore è la probabilità di riscontrare depositi patologici di α -sin. [129]

Gli anticorpi utilizzati per evidenziare i depositi patologici di α -sin possono essere diretti contro la forma nativa della proteina o la forma fosforilata. L'uso di anticorpi per la forma nativa è ampiamente adottato per la ricerca dei corpi di Lewy a livello encefalico, potendo identificare aggregati di grosse dimensioni della proteina chiaramente di significato patologico. Nella cute i depositi patologici che possono essere evidenziati non sono LBs (presenti a livello del corpo cellulare dei neuroni) ma i LNs. In questo caso, l'utilizzo di anticorpi diretti contro la forma nativa di α -sin ha dimostrato una specificità inferiore rispetto a quanto non si osserva usando anticorpi per la forma fosforilata. [129]

Il sito del prelievo biotico rappresenta un elemento di non poco rilievo ai fini di una sensibilità ottimale della metodica. Nel PD e DLB, i dati suggeriscono che i depositi di P- α -sin nelle strutture nervose della cute hanno un pattern molto disomogeneo, con maggiore interessamento a livello prossimale che distale. Nel caso invece di sinucleinopatie con elevata componente disautonomica (PD/DLB con disautonomia e PAF) i depositi di P- α -sin sono molto più omogenei e diffusi, sia a livello prossimale che distale. [129] Pertanto, se nel caso di sinucleinopatie con elevata componente disautonomica la scelta del sito da biopsiare e il numero di sezioni da analizzare risulta irrilevante, nel caso delle forme di PD e DLB senza franca disautonomia sito e numero di sezioni da analizzare possono condizionare la sensibilità della metodica. [129] In questi casi sarebbe raccomandabile, sulla base dei dati finora disponibili, il prelievo di cute dalla regione cervicale, in sede paravertebrale, godendo questa di una maggiore sensibilità nel riscontro P- α -sin [116,123,125]. La presenza di una sintomatologia motoria lateralizzata, come tipico del PD, non sembra condizionare la probabilità di riscontro dei depositi di P- α -sin, poichè questi sono stati riscontrati ugualmente sia nel campione omolaterale che in quello controlaterale al lato affetto dal parkinsonismo. [130] Rimane ancora dubbio il pattern di distribuzione dei depositi di P- α -sin nell'MSA e quale sia pertanto il sito ottimale da biopsiare nel sospetto di tale condizione. [129]

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Le evidenze a tutt'oggi disponibili suggeriscono che la biopsia di cute sia uno strumento in grado di identificare i pazienti affetti da PD e DLB a confronto con individui sani o affetti da altra patologia neurologica (non sinucleinopatia) con una specificità fino al 100%. [116,125] Tuttavia, l'esistenza di casi di individui sani di età avanzata che presentano, all'autopsia, depositi patologici di α -sinucleina sia a livello encefalico [56-75] che nei tessuti periferici [92-107], rende ragionevole ipotizzare che la biopsia di cute possa avere limitata specificità in tale fascia d'età.

L'obiettivo primario del presente studio è pertanto quello di valutare se la biopsia di cute impiegata per la diagnosi di sinucleinopatia risenta o meno della possibile presenza di una malattia a corpi di Lewy incidentale nella cute, con conseguente limitazione della sua applicabilità nella fascia d'età anziana.

L'obiettivo secondario dello studio è quello di valutare se sono riscontrabili, nella popolazione anziana non affetta da demenza e/o parkinsonismo, depositi "incidentali" di P- α -sinucleina nelle terminazioni nervose della cute.

L'endpoint primario dello studio è la valutazione della specificità della biopsia di cute finalizzata alla diagnosi di sinucleinopatia quando applicata a pazienti affetti da sospetta sinucleinopatia a confronto con controlli sani di età avanzata.

L'endpoint secondario dello studio è la determinazione della percentuale di soggetti sani (privi di demenza e/o parkinsonismo) di età avanzata che presentano depositi di P- α -sinucleina a livello cutaneo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione in studio

Pazienti e controlli arruolati nel presente studio sono stati reclutati presso la Struttura di Neurologia dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Cagliari e l'Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna nel periodo compreso tra Giugno 2017 e Maggio 2019.

La popolazione in studio è composta da due gruppi: individui privi di patologia neurologica e pazienti affetti da sinucleinopatia.

Individui privi di patologia neurologica (gruppo SANI)

Rappresentano il gruppo principale in studio. I criteri di inclusione previsti per il loro reclutamento sono i seguenti:

- Età superiore a 70 anni.
- Assenza di segni e/o sintomi di parkinsonismo. I soggetti sono stati valutati da un Neurologo con esperienza in disturbi del movimento mediante valutazione anamnestica ed esame obiettivo neurologico. La valutazione clinica ha compreso la somministrazione della parte motoria della scala UPDRS. [140] Questa prende in considerazione diversi item motori con assegnazione per ognuno di un punteggio da zero a quattro. In accordo con le linee guida sull'interpretazione dell'UPDRS, nei soggetti anziani è considerato nei limiti della norma uno score da zero a uno in tutti gli items con l'eccezione di quelli relativi al tremore. Ciò si deve, in parte, alla presenza di sfumati segni "parkinsoniani" nella popolazione anziana sana. [141] In accordo con Ross e colleghi si è pertanto stabilito di includere nel gruppo SANI soggetti con un punteggio della scala UPDRS III <2 in tutti gli items con l'eccezione di quelli relativi alla sintomatologia tremorigena. [142]
- Assenza di demenza. I soggetti sono stati valutati da un Neurologo con esperienza in disturbi cognitivi. L'età talora molto avanzata dei soggetti, unitamente alla presenza di comorbilità con impatto sull'autonomia funzionale (patologie osteoarticolari, ipoacusia, disturbi della vista) hanno limitato l'applicabilità di scale cognitive quali Mini Mental State Examination o la Montreal Cognitive Assessment. Inoltre, molti soggetti presentavano un grado di istruzione (analfabetismo) non previsto nelle scale di correzione normativa dei test. La valutazione del quadro cognitivo si è pertanto basata sulla verifica dell'autonomia dei soggetti nelle attività del quotidiano (scale ADL e IADL) fatto salvo per quelle attività la cui esecuzione fosse limitata da una disabilità di natura non neurologica.

- Assenza di sintomi suggestivi di sinucleinopatia. In particolare sono state escluse, mediante colloquio anamnestico, alterazioni del sonno compatibili con RBD valutate mediante questionario specifico [143], disturbi psichiatrici, allucinazioni, fluttuazioni cognitive, alterata sensibilità ai neurolettici.

I criteri di esclusione previsti per il gruppo SANI sono i seguenti:

- Presenza di sintomatologia tremorigena;
- disabilità severa da cause non neurologiche e tale da interferire con la valutazione obiettiva dei segni e sintomi motori;
- terapia con anticoagulante o con doppia antiaggregazione;
- alterazioni della cute nella sede di prelievo;

Pazienti affetti da sinucleinopatia (Gruppo PD/DLB)

I criteri di inclusione per il reclutamento di pazienti in questo gruppo sono stati i seguenti:

- età superiore a 70 aa
- diagnosi di Malattia di Parkinson (PD) secondo i criteri MDS 2017 [144] o diagnosi di Demenza a corpi di Lewy secondo i criteri di McKeith 2017 [12];

I criteri di esclusione sono stati i seguenti:

- terapia con anticoagulante o con doppia antiaggregazione;
- alterazioni della cute nella sede di prelievo;

3.2 Metodologia di prelievo e analisi del campione bioptico

Per la scelta del sito di prelievo e del metodo di analisi del campione si è fatto riferimento agli studi che hanno dimostrato la migliore sensibilità della biopsia di cute applicata alla diagnostica delle sinucleinopatie. [116, 123-125, 128-130]

La biopsia di cute è stata eseguita mediante l'utilizzo di Punch cutaneo da 3 mm. Sono stati prelevati due campioni di cute dalla regione cervicale, lateralmente alla vertebra C7-C8, due campioni dalla regione della coscia distale (15 cm sopra la rotula), e due campioni dalla regione perimalleolare (10 cm sopra il malleolo laterale). I due campioni prelevati da ogni sito erano distanziati l'uno dall'altro di circa 2-3 cm. Per i pazienti considerati più fragili, e con visibili

alterazioni trofiche della cute degli arti inferiori, si è optato per eseguire il solo prelievo dalla regione cervicale, considerato da solo in grado di evidenziare depositi di P- α -sinucleina nel PD/DLB con sensibilità del 100%. [116,125] I frammenti di cute prelevati sono stati fissati per 24 h in una soluzione di paraformaldeide e acido picrico (Soluzione Zamboni) a 4°C e successivamente posti in soluzione di PBS e saccarosio al 20% fino alla fase di taglio. Ogni campione è stato quindi tagliato a fresco al criostato per ottenere sezioni di 10 μ m. Per ogni prelievo sono state raccolte da 3 a 5 sezioni ottenute a diverse profondità così da campionare l'intero spessore della biopsia. Le sezioni sono state quindi incubate fino al giorno successivo con due anticorpi primari: anti-mouse PGP 9.5 (1:750; Abcam) e anti α -sinucleina fosforilata alla Serina 129 (anti rabbit p-syn) , (1:500, Abcam). Le sezioni sono state quindi lavate e incubate per un'ora con anticorpi secondari: anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:400, Jackson ImmunoResearch) e anti-rabbit cyanine dye fluorophores 3.18 (1.200, Jackson ImmunoResearch). Le sezioni sono state analizzate al microscopio da due esperti in immunofluorescenza. La co-localizzazione della fluorescenza per P- α -sinucleina e PGP 9.5 ha permesso di escludere eventuali positività di natura artefattuale.

4. RISULTATI

Sono stati reclutati nel presente studio 49 individui di età superiore a 70 anni.

Il gruppo SANI è costituito da 29 soggetti di età compresa tra 71 e 103 anni (età media 83 anni). 10 soggetti (35 %) avevano un'età compresa tra 70 e 80 aa, 16 soggetti (55%) avevano età compresa tra 80 e 90 aa e 3 soggetti (10%) avevano età compresa tra 90 e 103 anni (Figura 6).

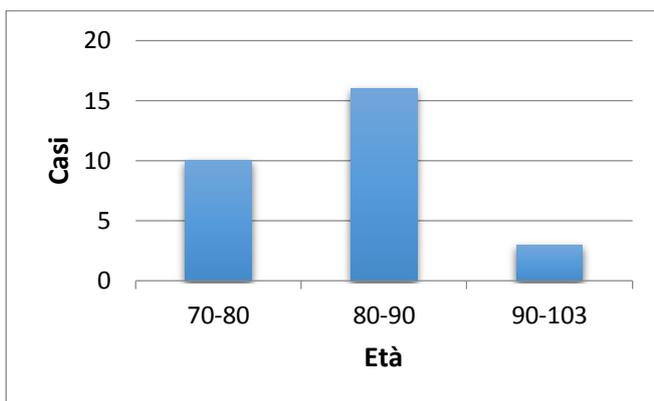


Figura 6: Età dei soggetti appartenenti al gruppo SANI

15/29 soggetti hanno eseguito il prelievo di cute su tutti e tre i siti (cervicale, coscia e gamba); 1 soggetto ha eseguito il prelievo di cute solo sulla regione cervicale e la gamba, 2/29 hanno eseguito il prelievo sulla regione cervicale e sulla coscia; i restanti 11/29 hanno eseguito il prelievo solo sulla regione cervicale.

L'analisi con immunofluorescenza indiretta della cute ha dimostrato la presenza di numerose fibre con immunoreattività per il PGP. In particolare sono stati evidenziati il plesso subepidermico da cui originano le piccole fibre destinate all'epidermide, le fibre nervose destinate agli annessi cutanei del derma (ghiandole sudoripare e sebacee, muscoli orripilatori), alle strutture vascolari o raggruppati in fasci a decorso intradermico. In nessuna delle strutture con immunoreattività per il PGP è stata identificata una concomitante immunoreattività per P- α -sinucleina. Il dato indica l'assenza di depositi di P- α -sinucleina nelle terminazioni nervose in ognuno dei siti indagati nel gruppo dei SANI. (Figura 7)

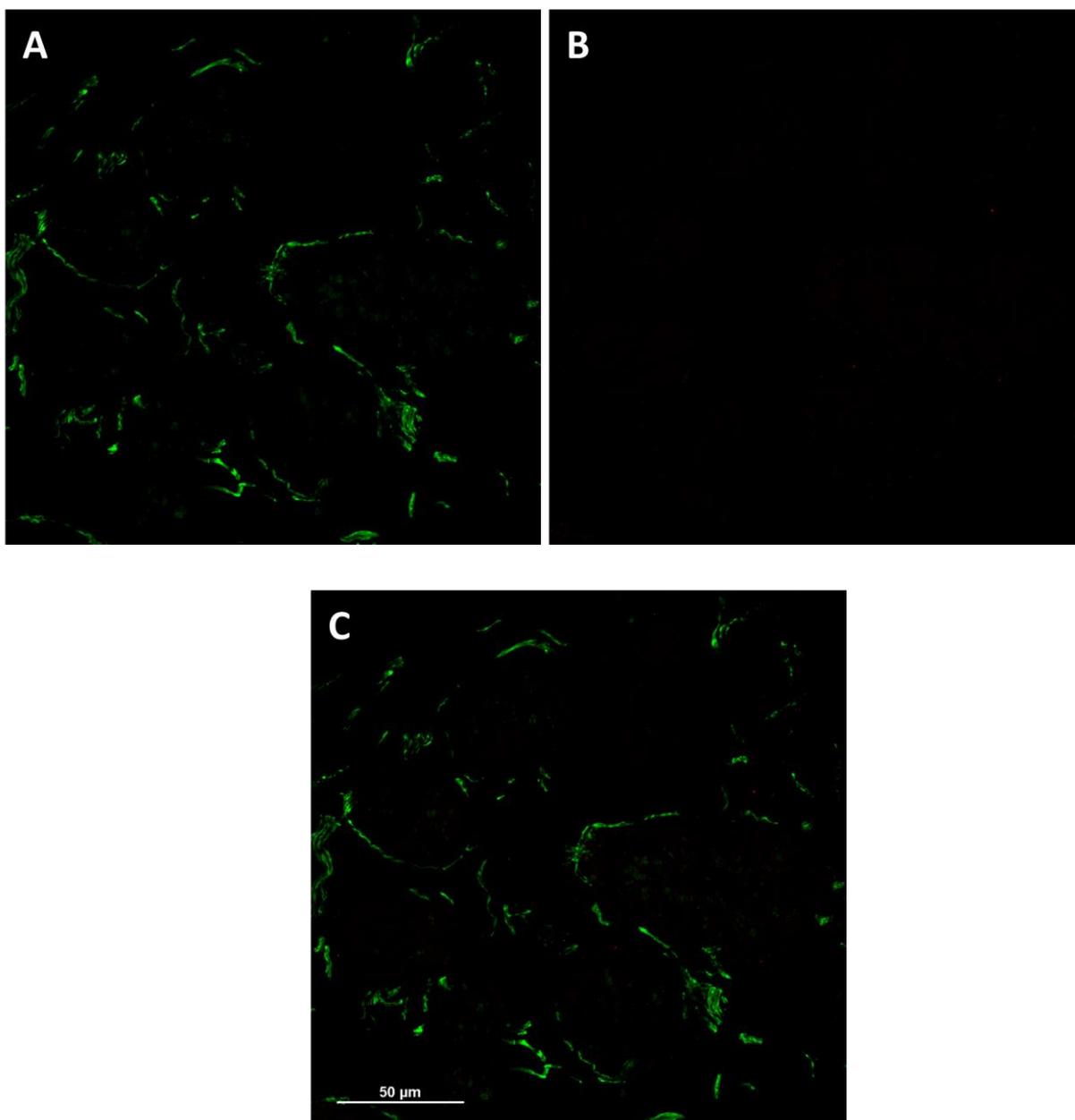


Figura 7: Biopsia di cute in un soggetto del gruppo SANI. A: immunoreattività per PGP (verde) con evidenza di fibre nervose intradermiche. B: assenza di immunoreattività per P- α -sin (rosso) C: merge (PGP e P- α -sin).

Il gruppo di pazienti affetti da sinucleinopatia è costituito da 13 soggetti con diagnosi di DLB e 7 soggetti con diagnosi di PD. I pazienti avevano complessivamente un'età compresa tra 70 e 84 anni (età media 76 anni). 19 su 20 pazienti hanno eseguito il prelievo di due campioni di cute dal sito cervicale, 19 su 20 pazienti hanno eseguito il medesimo prelievo dalla coscia e 18 pazienti su 20 hanno eseguito il prelievo di cute dalla gamba. Tabella 1

L'analisi in immunofluorescenza ha consentito, anche in questo gruppo, di evidenziare strutture cutanee immunoreattive per il PGP, corrispondenti all'innervazione cutanea epidermica e dermica. Depositi di P- α -sinucleina sono stati evidenziati in corrispondenza di alcune strutture nervose intradermiche in tutti i soggetti affetti da sinucleinopatia.

I prelievi bioptici dai siti cervicale e coscia sono risultati positivi in tutti i casi prelevati in tale sede; i prelievi bioptici della regione distale (gamba) sono risultati positivi in 12 casi su 17 soggetti prelevati in tale sede (70%). Tabella 1

La co-localizzazione dell'immunoreattività per P- α -sinucleina e per PGP ha confermato la localizzazione intranervosa di tali depositi. (Figura 8)

	Patologia	Età	Sito cervicale	Sito coscia	Sito gamba
1	DLB	70	+	+	+
2	DLB	75	+	+	+
3	DLB	75	+	+	+
4	DLB	78	+	+	+
5	DLB	81	NE	+	+
6	DLB	84	+	+	+
7	DLB	71	+	+	NE
8	DLB	74	+	+	+
9	DLB	78	+	+	-
10	DLB	77	+	+	+
11	DLB	79	+	NE	NE
12	DLB	79	+	+	+
13	DLB	79	+	+	+
14	PD	74	+	+	-
15	PD	78	+	+	+
16	PD	75	+	+	-
17	PD	71	+	+	-
18	PD	72	+	+	-
19	PD	78	+	+	NE
20	PD	75	+	+	+

Tabella 1. Biopsie di cute nel Gruppo PD/DLB. +: sito con almeno una biopsia positiva; - : sito con nessuna biopsia positiva; NE: prelievo non eseguito

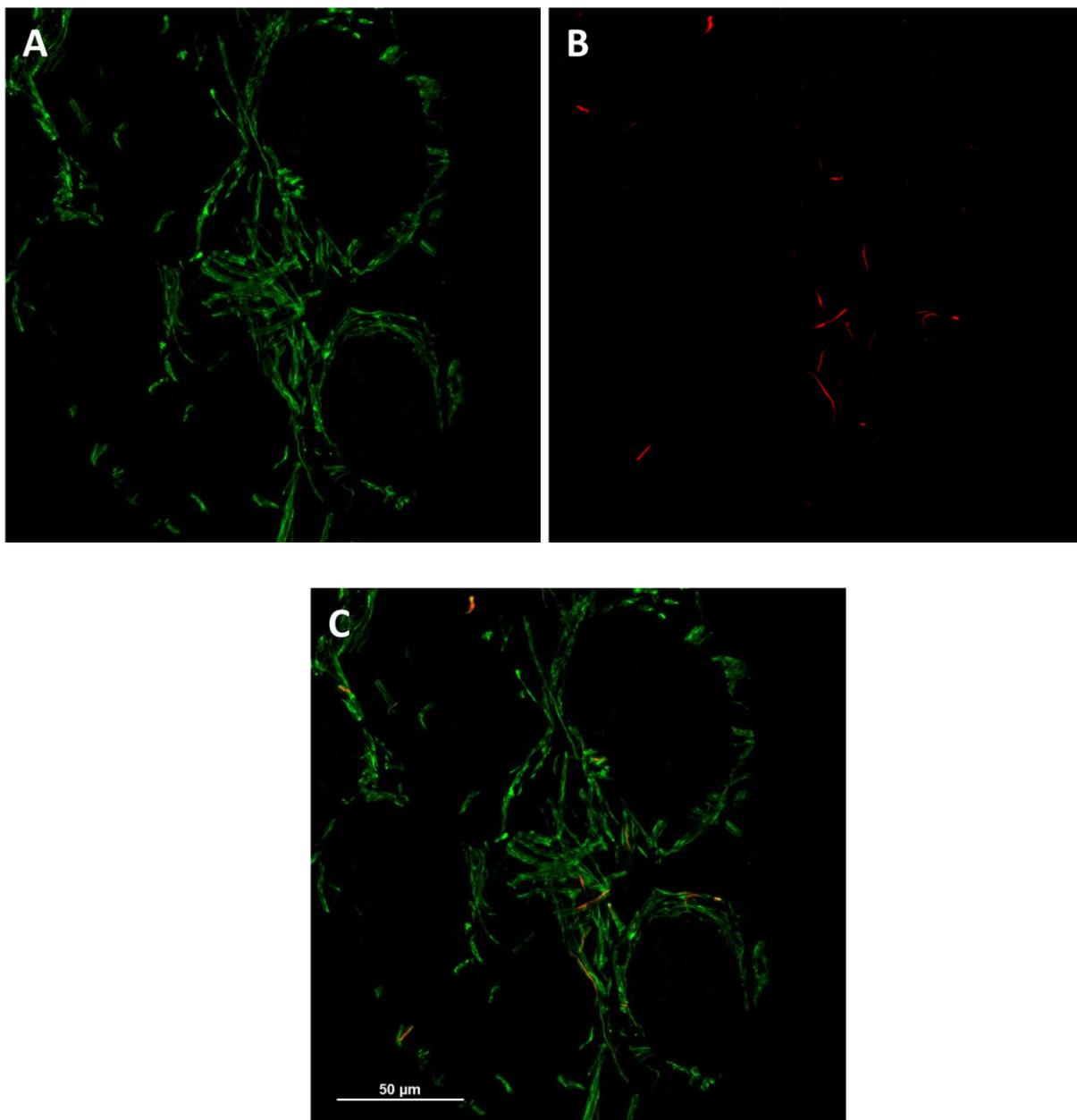


Figura 8: Biopsia di cute in un soggetto del gruppo PD/DLB. A: immunoreattività per PGP (verde) con evidenza di fibre nervose intradermiche. B: presenza di immunoreattività per P- α -sin(rosso) in alcune fibre nervose. C: merge con evidenza di co-localizzazione dell'immunoreattività per PGP e P- α -sin a confermare la localizzazione intraneuronale della P- α -sinucleina

5. DISCUSSIONE

Nel presente studio, depositi di P- α -sinucleina sono stati ricercati nelle terminazioni nervose della cute di individui sani di età superiore a 70 anni a confronto con pazienti affetti da PD e DLB.

In tutti i casi di PD/DLB la biopsia di cute ha dimostrato la presenza di immunoreattività per P- α -sinucleina, con maggiore percentuale di positività riscontrate nel sito cervicale e nella coscia. Questo dato conferma quanto già dimostrato in precedenti lavori, supportando l'utilizzo della biopsia di cute per la diagnosi di PD e DLB. [114-119,121,122,125,129,130] Tuttavia, rispetto alla letteratura pregressa, nel presente lavoro i pazienti e soprattutto i controlli sani presentavano un'età media sensibilmente superiore rispetto a quanto non riportato in precedenti lavori. Donadio e colleghi hanno studiato la biopsia di cute confrontando pazienti affetti da PD, con età media di circa 71 ± 8 anni, con individui sani con età media di circa 67 ± 7 anni, [116]; hanno anche valutato pazienti affetti da PD con età media di 68 ± 7 a confronto con controlli sani con età media di 61 ± 13 aa e infine hanno confrontato pazienti affetti da DLB con età media di 72 ± 8 anni con controlli sani con età media di 67 ± 12 anni [125]. Doppler e colleghi hanno analizzato la biopsia di cute in pazienti affetti da PD con età media di 66,9 anni a confronto con soggetti sani di età media di 61 anni [117] e hanno anche confrontato pazienti affetti da PD con età media di 65 anni con controlli sani con età media di 59,9 anni [115]. In un ulteriore lavoro la biopsia di cute è stata impiegata in pazienti affetti da PD a confronto con controlli sani di età media di circa $62 \pm 10,9$ [118]. Nel presente studio l'età media dei pazienti PD/DLB era di 76 anni, e l'età media dei soggetti sani di controllo era di 83 anni. L'età dei soggetti del gruppo SANI risultava pertanto sovrapponibile a quella riportata nelle principali casistiche autoptiche che hanno indagato la prevalenza della malattia a corpi di Lewy incidentali (ILBD) nella popolazione. [57-75] I dati di prevalenza della ILBD nelle casistiche autoptiche sono molto variabili, compresi tra lo 0% [65] e il 33.6% [75] a seconda della casistica. Considerate nell'insieme, la prevalenza media di ILBD che viene descritta è di circa il 15% della popolazione autoptica [56-75] e la stratificazione in base all'età sembra suggerire una maggiore prevalenza in ottava decade. [58,82] Nella presente casistica 29 individui sani di età superiore a 70 aa sono stati arruolati. Se si considera una prevalenza di ILBD del 15%, si potrebbe ipotizzare che circa 4 dei soggetti sani della presente casistica potrebbe rappresentare un ILBD. Tuttavia, in nessuno dei soggetti sani dello studio sono stati riscontrati depositi di P- α -sinucleina nelle terminazioni nervose della cute. Questo dato, unitamente alla presenza di depositi cutanei di P- α -sinucleina in tutti i pazienti affetti da PD/DLB,

suggerisce che la specificità della biopsia di cute per la diagnosi di PD/DLB si mantiene del 100% anche quando questa viene applicata nella popolazione anziana a rischio per ILBD.

Non è stato mai stabilito se la ILBD sia caratterizzata dalla presenza di depositi patologici di α -sinucleina anche nelle terminazioni nervose della cute. Il solo studio autoptico nel quale P- α -sinucleina è stata ricercata nelle fibre nervose cutanee di individui con ILBD ha previsto l'analisi della cute dell'addome e dello scalpo e non ha dimostrato la presenza di tali depositi sia nei soggetti ILBD che nei pazienti affetti da PD. [107] L'assenza di studi finalizzati a indagare la presenza di un interessamento delle terminazioni nervose della cute nella ILBD (verificata autopticamente), in particolare nei siti più coinvolti nelle sinucleinopatie (regione cervicale) non consente di escludere l'esistenza di una ILBD cutanea.

Nel presente studio, la presenza di individui con ILBD nell'ambito del gruppo SANI può essere solo postulata sulla base dei dati epidemiologici relativi alla ILBD stessa. La conferma della "diagnosi" di ILBD richiede, infatti, la valutazione autoptica dell'encefalo. Tuttavia, l'osservazione, in casi di ILBD, di depositi di P- α -sinucleina a livello periferico (fibre nervose miocardiche, ghiandola surrenale) in assenza di documentati LBs encefalici tiene aperta l'ipotesi circa l'esistenza di una ILBD esclusivamente periferica. [95,145] Nella presente casistica, nessuno dei 29 soggetti sani anziani presentava depositi di P- α -sinucleina nelle terminazioni nervose della cute.

Questo risultato offre due diverse possibilità interpretative. Una possibilità è che nessuno dei 29 individui sani anziani sia un ILBD ed è questo il motivo per cui la cute, come verosimilmente altri distretti, non è interessata alla patologia da deposito di α -sinucleina. I dati epidemiologici sulla prevalenza della ILBD nella popolazione della stessa fascia d'età di quella in studio rendono tuttavia improbabile questa interpretazione. L'altra possibilità è che la ILBD rappresenti una forma di sinucleinopatia in cui i depositi patologici di P- α -sinucleina che sono stati riscontrati sui gangli simpatici, nel plesso cardiaco, nel midollo spinale, nella ghiandola sottomandibolare, nel sistema nervoso enterico, nella retina, e nei nervi vago e sciatico [92-107] non sono invece presenti nelle terminazioni nervose della cute.

Alcuni Autori hanno ipotizzato che la ILBD possa rappresentare la fase preclinica del PD o della DLB. [57,58,72] Questa ipotesi è sostenuta innanzitutto dalla presenza di una simile distribuzione dei LBs encefalici nella ILBD e nel PD e dal riscontro, nella ILBD, di una disfunzione del sistema nigrostriatale di grado intermedio tra soggetti normali e pazienti affetti da PD. [85,86]

Se la ILBD rappresenta la fase preclinica del PD, resta da stabilire il motivo per cui in questi soggetti la sinucleinopatia rimanga asintomatica. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che essi

non sono vissuti sufficientemente a lungo perchè comparissero i segni e sintomi di malattia, o perchè in essi la condizione patologica si è autolimitata, eventualmente per la presenza di meccanismi di protezione.[89,96] Qualora la ILBD rappresenti la fase preclinica del PD/DLB, l'assenza di un interessamento delle terminazioni nervose cutanee nel processo di accumulo patologico di α -sinucleina potrebbe suggerire il mancato interessamento di tale distretto nella fase precoce di tali malattie. Qualora, invece, la ILBD non rappresenti la fase preclinica di PD/DLB ma piuttosto una forma di sinucleinopatia diversa, e non sintomatica, il mancato interessamento della cute in tale condizione supporterebbe ulteriormente l'impiego della biopsia di cute per la diagnosi differenziale di PD/DLB da altre forme, asintomatiche e non progressive, di sinucleinopatia.

Nonostante i dati epidemiologici relativi alla prevalenza della ILBD nella popolazione di età avanzata suggeriscano che, con buona probabilità, il campione dei soggetti SANI del presente studio possa comprendere casi di ILBD, tale dato può essere confermato solo autopticamente. Questo rappresenta il principale limite del presente studio: qualsiasi affermazione relativa alla ILBD è irrimediabilmente limitata dal fatto che essa rappresenta una diagnosi autoptica.

Relativamente alla valutazione della specificità della biopsia di cute nella diagnosi di sinucleinopatia in soggetti di età avanzata, un limite dello studio è rappresentato dall'esiguità del campione analizzato. Tuttavia, avendo osservato una specificità del 100% è tuttavia verosimile che, anche con un campione più numeroso, la biopsia di cute presenti comunque una elevata specificità diagnostica.

6. CONCLUSIONI

La biopsia di cute rappresenta, ad oggi, il più promettente strumento per la diagnosi in vita di malattia di Parkinson e Demenza corpi di Lewy. I depositi patologici di α -sinucleina nelle terminazioni nervose della cute rappresentano un biomarcatore di sinucleinopatia, e come tal potrebbero essere presenti anche in una sinucleinopatia asintomatica quale la malattia a corpi di Lewy incidentali. Nel presente studio, l'evidenza che i depositi patologici di α -sinucleina sono assenti in individui sani di età molto avanzata (e pertanto potenzialmente a rischio di ILBD), suggerisce che la biopsia di cute conservi un ottimo potere predittivo positivo anche quando applicata alla popolazione di questa fascia d'età. I risultati del presente studio, inoltre, sembrerebbero suggerire l'assenza di un interessamento delle terminazioni nervose della cute in una condizione, la ILBD, considerata da molti Autori come la fase preclinica del PD.

I risultati ottenuti, qualora confermati su casistiche più estese e con eventuale supporto della diagnostica autoptica post-mortem, non solo presentano delle chiare implicazioni relativamente all'utilizzo diagnostico della biopsia di cute, ma contribuiscono anche ad ampliare le nostre conoscenze attuali relative alla fisiopatologia delle sinucleinopatie.

1.1 Bibliografia

- [1] Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. London:Whittingham and Roland, 1817.
- [2] MH Polymeropoulos, C Lavedan, E Leroy, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276 (1997), pp. 2045–2047
- [3] O Corti, S Lesage, A Brice. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*, 91 (2011), pp. 1161–1218
- [4] MA Hely, JGL Morris, WGJ Reid, R Trafficante. Sydney multicenter study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *MovDisord*, 20 (2005), pp. 190–199
- [5] MA Hely, WGJ Reid, MA Adena, GM Halliday, JGL Morris. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *MovDisord*, 23 (2008), pp. 837–844
- [6] Levy G, *et al.* Combined effect of age and severity on the risk of dementia in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2002; 51:722–9
- [7] Muslimovic D, Post B, Speelman JD, Schmand B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*. 2005; 65:1239–45
- [8] Rosenthal E, *et al.* Association between cognition and function in patients with Parkinson disease with and without dementia. *Mov Disord*. 2010; 25:1170–6
- [9] Emre M. Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2003;2:229–237
- [10] McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, *et al.* Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 1996;47:1113–1124
- [11] C. F. Lippa, J. E. Duda, M. Grossman, *et al.* DLB and PDD boundary issues: Diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers. *Neurology* 2007;68;812-819
- [12] I.G. McKeith, B. F. Boeve, D. W. Dickson, G Halliday, *et al.* Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 2017 Jul 4;89(1):88-100
- [13] S. Gilman, G.K. Wenning, *et al.* Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008;71:670–676
- [14] Polymeropoulos MH , Lavedan C , Leroy E *et al.* Mutation in the α - synuclein gene identified in families with Parkinson ' s disease . *Science* 1997 ; 276 : 2045 – 2047
- [15] Spillantini MG , Schmidt ML , Lee VM , Trojanowski JQ , Jakes R , Goedert M. α - Synuclein in Lewy bodies . *Nature* 1997 ; 388 : 839 – 840

- [16] Spillantini MG , Crowther RA , Jakes R , Hasegawa M , Goedert M. α Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson ' s disease and dementia with Lewy bodies . ProcNatlAcadSci USA 1998 ; 95 : 6469 – 6473
- [17]Serpell LC , Berriman J , Jakes R , Goedert M , Crowther RA .F iber diffraction of synthetic α - synucleinfi laments shows amyloid- like cross - β conformation . ProcNatlAcad Sci USA 2000 ; 97 : 4897 – 4902
- [18] Goedert M. α - Synuclein and neurodegenerative diseases . NatRevNeurosci 2001 ; 2 : 492 – 501)
- [19] Maroteaux L , Campanelli JT , Scheller RH . Synuclein: a neuron specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal . J Neurosci 1988 ; 8 : 2804 – 2815
- [20] Jensen PH, Gai WP (2001) Alpha-synuclein. Axonal transport, ligand interaction, and neurodegeneration. In: Tolnay M, Probst A (eds) Neuropathology and genetics of dementia. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp 129–134
- [21] Fujiwara H , Hasegawa M , Dohmae N et al. α - Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions . N at Cell Biol 2 002; 4 : 160 – 164
- [22] Ding and Keller 2001; Chung et al, 2001; McNaught and Jenner 2001; Stolzing and Grune 2001
- [23] Parkkinen L, Pirttilä T, Tervahauta M, Alafuzoff I. Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. Neuropathology. 2005 Dec;25(4):304-14
- [24]Lee VM, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. Neuron. 2006 Oct 5;52(1):33-8.
- [25] Braak H , del Tredici K , R ü b U , de Vos RA , Jansen Steur EN , Braak E . S taging of brain pathology related to sporadic Parkinson ' s disease. Neurobiol Aging 2003 ; 24 : 197 – 211
- [26] Dickson DW , Uchikado H , Fujishiro H , Tsuboi Y . Evidence in favor of Braak staging of Parkinson ' s disease . MovDisord 2010 ; 25 Suppl 1 : S78 – 82
- [27] Jellinger KA. Critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson ' s disease . AnnNeurol 2010 ; 67 : 550
- [28] Brundin P , Li JY , Holton JL , Lindvall O , Revesz T . Research in motion: the enigma of Parkinson ' s disease pathology spread. N at Rev Neurosci 2008 ; 10 : 741 – 745
- [29] Goedert M , Clavaguera F , Tolnay M . The propagation of prion - like protein inclusions in neurodegenerative diseases. T rendsNeurosci 2010 ; 33 : 317 – 325

- [30] Halliday G, Murphy K. Pathology of Parkinson's disease- an overview. 2010 Movement Disorders 4. pp.132-154
- [31] Porritt MJ, Kingsbury AE, Hughes AJ, Howells DW. Striatal dopaminergic neurons are lost with Parkinson's disease progression. *MovDisord* 2006;21:2208-2211)
- [32] Mori F, Tanji K, Zhang H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alpha-Synuclein pathology in the neostriatum in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008;115:453-459
- [33] Riederer P, Gerlach M, Muller T, Reichmann H. Relating mode of action to clinical practice: dopaminergic agents in Parkinson's disease. *ParkinsonismRelatDisord* 2007;13:466-479
- [34] Halliday G , Hely M , Reid W , Morris J . The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008 ; 115 : 409 – 415
- [35] C.F. Lippa, J.E. Duda, M. Grossman, H.I. Hurtig et al. DLB and PDD boundary issues: Diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers. *Neurology* 2007;68:812–819
- [36] 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: 197 – 211
- [37] Braak H , Ghebremedhin E , Rüb U , Bratzke H , Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease - related pathology . *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121 – 134
- [38] Braak H , Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2009; 201:1 – 119
- [39] Trojanowski JQ , Revesz T . Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy . *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33: 615 – 620
- [40] Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A et al. Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Europ J Neurology*, 2016, 23:247-261
- [41] Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984;87:848-856
- [42] Del Tredici K, Duda JE. Peripheral Lewy body pathology in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease: four cases. *J Neurol Sci* 2011; 310:100-106
- [43] Braak H, de Vos RA, 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; 396:67-72
- [44] Beach TG, Adler CH, Sue LI et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2010; 119:689-702

- [45] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E et al. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24:e202-e205
- [46] Lebouvier T, Coron E, Chaumette T et al. Rupture of colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 2010. 22:e11-e14
- [47] Lebouvier T, Chaumette T, Damier P et al. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 2008; 57:1741-1743
- [48] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2014; 127:235-241
- [49] Shannon K.M., Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya H.B. et al. Alpha-Synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012, 27:6.
- [50] Aldecoa I, Navarro-Otano J, Stefanova N, Sprenger F.S, Seppi K, Poewe W, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. *Neurosc Lett* 2015; 602:145-149
- [51] Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2010, 119:703-713
- [52] Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, Shill HA, Sue LI, Sabbagh MN, Akiyama H; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Submandibular Gland Biopsy for the Diagnosis of Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013, 72(2):130-136
- [53] Adler CH, Dugger BN, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, Hidalgo J, Henry-Watson J, Serrano G, Sue LI, Nagel T, Duffy A, Shill HA, Akiyama H, Walker DG, Beach TG. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* 2014 Mar 11;82(10):858-64
- [54] Beach TG, White CL 3rd, Hladik CL et al. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009; 117:169-174
- [55] Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 2014; 29:1010-1018
- [56] Lipkin LE. Cytoplasmic inclusions in ganglion cells associated with parkinsonian states: a neurocellular change studied in 53 cases and 206 controls. *Am J Pathol.* 1959 Nov-Dec;35:1117-33
- [57] Forno L.S. Concentric hyaline intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Soc.* 1969 Jun;17(6):557-75
- [58] Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988 Jun;51(6):745-52

- [59] Jendroska K, Olasode BJ, Daniel SE, Elliott L, Ogunniyi AO, Aghadiuno PU, Osuntokun BO, Lees AJ. Incidental Lewy body disease in black Africans. *Lancet*. 1994 Sep 24;344(8926):882-3
- [60] Perry RH, Irving D, Tomlinson BE. Lewy body prevalence in the aging brain: relationship to neuropsychiatric disorders, Alzheimer-type pathology and catecholaminergic nuclei. *J Neurol Sci*. 1990 Dec;100(1-2):223-33
- [61] Tsuboi Y, Ahlskog JE, Apaydin H, Parisi JE, Dickson DW. Lewy bodies are not increased in progressive supranuclear palsy compared with normal controls. *Neurology*. 2001 Nov 13;57(9):1675-8.
- [62] Parkkinen L, Soininen H, Laakso M, Alafuzoff I. Alpha-synuclein pathology is highly dependent on the case selection. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2001;27:314-25
- [63] Parkkinen L, Soininen H, Alafuzoff I. Regional distribution of alpha-synuclein pathology in unimpaired aging and Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2003;62:363-7
- [64] Wakisaka Y, Furuta A, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Iida M, Iwaki T. Age-associated prevalence and risk factors of Lewy body pathology in a general population: the Hisayama study. *Acta Neuropathologica* 2003;106:374-82
- [65] Jellinger KA. Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution-- a pilot study. *Acta Neuropathol*. 2003 Sep;106(3):191-201
- [66] Jellinger KA. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004 Oct;111(10-11):1219-35
- [67] Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Nov;62(11):1087-95
- [68] Mikolaenko I, Pletnikova O, Kawas CH, O'Brien R, Resnick SM, Crain B, Troncoso JC. Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Feb;64(2):156-62
- [69] Markesbery WR, Jicha GA, Liu H, Schmitt FA. Lewy body pathology in normal elderly subjects. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Jul;68(7):816-22
- [70] Frigerio R, Fujishiro H, Maraganore DM, Klos KJ, DelleDonne A, Heckman MG, Crook JE, Josephs KA, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW, Ahlskog JE. Comparison of risk factor profiles in incidental Lewy body disease and Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2009 Sep;66(9):1114-9
- [71] Adler CH, Connor DJ, Hentz JG, Sabbagh MN, Caviness JN, Shill HA, Noble B, Beach TG. Incidental Lewy body disease: clinical comparison to a control cohort. *Mov Disord*. 2010 Apr 15;25(5):642-6.

- [72] Frigerio R, Fujishiro H, Ahn TB, Josephs KA, Maraganore DM, DelleDonne A, Parisi JE, Klos KJ, Boeve BF, Dickson DW, Ahlskog JE. Incidental Lewy body disease: do some cases represent a preclinical stage of dementia with Lewy bodies? *Neurobiol Aging*. 2011 May;32(5):857-63.
- [73] van de Berg WD, Hepp DH, Dijkstra AA, Rozemuller JA, Berendse HW, Foncke E. Patterns of α -synuclein pathology in incidental cases and clinical subtypes of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Jan;18 Suppl 1:S28-30.
- [74] Caviness JN. Presymptomatic Parkinson's disease: the Arizona experience. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Jan;18 Suppl 1:S203-6
- [75] Coughlin DG, Petrovitch H, White LR, Noorigian J, Masaki KH, Ross GW, Duda JE. Most cases with Lewy pathology in a population-based cohort adhere to the Braak progression pattern but 'failure to fit' is highly dependent on staging system applied. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 Mar 28. pii: S1353-8020(19)30183-X
- [76] Yokochi M, Narabayashi H, Iizuka R, Nagatsu T. Juvenile Parkinsonism-some clinical, pharmacological, and neuropathological aspects. *Adv Neurol* 1984;40:407-13
- [77] Sigwald J, Lapresle J, Raverdy P, Recondo NJ. Atrophie cérébelleuse familiale avec association de lésions nigériennes et spinales. *Presse Med* 1964;72:557-62
- [78] Sachdev HS, Forno LS, Kane CA. Joseph disease: a multisystem degenerative disorder of the nervous system. *Neurology* 1982;32:192-5
- [79] Dooling EC, Schoene WC, Richardson EP. Hallervorden-Spatz syndrome. *Arch Neurol* 1974;30:70-83
- [80] Agamanolis DP, Greenstein JI. Ataxia-teleangiectasia. Report of a case with Lewy bodies and vascular abnormalities within cerebral tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 1979;38:475-89
- [81] Hirano A, Kurland LT, Sayre GP. Familial amyotrophic lateral sclerosis. A subgroup characterized by posterior and spinocerebellar tract involvement and hyaline inclusions in the anterior horn cells. *Arch Neurol* 1967;16:232-43
- [82] Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 May;61(5):413-26
- [83] Lowe J. Neuropathology of dementia with Lewy bodies. *Handb Clin Neurol* 2008 ; 89 : 321 – 330
- [84] Uchikado H, Lin WL, DeLucia MW, Dickson DW. Alzheimer disease with amygdala Lewy bodies: a distinct form of alpha-synucleinopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 685 – 697
- [85] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Peirce JB, Bachalakuri J, Dalsing-Hernandez JE, Lue LF, Caviness JN, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG. Reduced striatal tyrosine hydroxylase in incidental Lewy body disease. *Acta Neuropathol*. 2008 Apr;115(4):445-51

- [86] DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2008 Aug;65(8):1074-80
- [87] Milber JM, Noorigian JV, Morley JF, Petrovitch H, White L, Ross GW, Duda JE. Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology*. 2012 Dec 11;79(24):2307-14
- [88] Dijkstra AA, Voorn P, Berendse HW, Groenewegen HJ; Netherlands Brain Bank, Rozemuller AJ, van de BergWD. Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2014 Sep;29(10):1244-51
- [89] Iacono D, Geraci-Erck M, Rabin ML, Adler CH, Serrano G, Beach TG, Kurlan R. Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time? *Neurology*. 2015 Nov 10;85(19):1670-9
- [90] Driver-Dunckley E, Adler CH, Hentz JG, Dugger BN, Shill HA, Caviness JN, Sabbagh MN, Beach TG; Arizona Parkinson Disease Consortium. Olfactory dysfunction in incidental Lewy body disease and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Nov;20(11):1260-2
- [91] Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Dec;33(6):599-614. Epub 2007 Oct 24.
- [92] 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 disease. *Neurology*. 1999 Apr 12;52(6):1269-71
- [93] Orimo S, Takahashi A, Uchihara T, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease. *Brain Pathol*. 2007 Jan;17(1):24-30
- [94] Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*. 2008 Mar;131(Pt 3):642-50.
- [95] Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Kuroda N, Orimo S. Incidental Lewy body disease restricted to the heart and stellate ganglia. *Mov Disord* 2009 Nov 15;24(15):2299-301
- [96] Dickson DW, Fujishiro H, DelleDonne A, Menke J, Ahmed Z, Klos KJ, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Ahlskog JE. Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008;115:437-444
- [97] Fujishiro H, Frigerio R, Burnett M, Klos KJ, Josephs KA, DelleDonne A, Parisi JE, Ahlskog JE, Dickson DW. Cardiac sympathetic denervation correlates with clinical and pathologic stages of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008 Jun 15;23(8):1085-92.

- [98] Navarro-Otano J, Gelpi E, Mestres CA, Quintana E, Rauek S, Ribalta T, Santiago V, Tolosa E. Alpha-synuclein aggregates in epicardial fat tissue in living subjects without parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Jan;19(1):27-31
- [99] Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006 Jun;32(3):284-95
- [100] Klos KJ, Ahlskog JE, Josephs KA, Apaydin H, Parisi JE, Boeve BF, DeLucia MW, Dickson DW. Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals. *Neurology.* 2006 Apr 11;66(7):1100-2.
- [101] Tamura T, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Lewy body-related α -synucleinopathy in the spinal cord of cases with incidental Lewy body disease. *Neuropathology* 2012 Feb;32(1):13-22.
- [102] Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2010 Jun;119(6):703-13
- [103] Beach TG, Adler CH, Serrano G, Sue LI, Walker DG, Dugger BN, Shill HA, Driver-Dunckley E, Caviness JN, Intorcchia A, Filon J, Scott S, Garcia A, Hoffman B, Belden CM, Davis KJ, Sabbagh MN; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Prevalence of Submandibular Gland Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies and other Lewy Body Disorders. *J Parkinsons Dis.* 2016;6(1):153-63
- [104] Del Tredici K, Duda JE. Peripheral Lewy body pathology in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease: four cases. *J Neurol Sci* 2011 Nov 15;310(1-2):100-6.
- [105] Ortuño-Lizarán I, Beach TG, Serrano GE, Walker DG, Adler CH, Cuenca N. Phosphorylated α -synuclein in the retina is a biomarker of Parkinson's disease pathology severity. *Mov Disord.* 2018 Aug;33(8):1315-1324
- [106] Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters* 396 (2006) 67–72
- [107] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010 Jun;119(6):689-702
- [108] Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 2014;128:755-766
- [109] Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of aging*, 1997; 18(4):351-357

- [110] Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Tanaka K, Suenaga T, Takahashi R. Value of in vivo α -synuclein deposits in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2019 Jul 19
- [111] Ikemura M, Saito Y, Sengoku R et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008; 67(10):945-953
- [112] Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 2014; 29:1010-1018
- [113] Gibbons CH, Wang N, Freeman R. Cutaneous Alpha-Synuclein From Paraffin Embedded Autopsy Specimens in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(3):503-509
- [114] Miki Y, Tomiyama M, Ueno T et al. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neuroscience Lett*, 2010; 469:357-359
- [115] Doppler K, Ebert S, Uceyler N et al. Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol*, 2014; 128:99-109
- [116] Donadio V, Incensi A, Leta V et al. Skin nerve α -synuclein deposits. A biomarker for idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 2014; 82:1362-1369
- [117] Doppler K, Weis J, Karl K et al. Distinctive distribution of phospho-alpha-synuclein in dermal nerves in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2015; 30(12):1688-92
- [118] Zange L, Noack C, Katrin H, Stenzel W, Lipp A. Phosphorylated α -synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Brain* 2015; 138;2310-2321
- [119] Haga R, Sugimoto K, Nishijima H, Miki Y, Suzuki C, Wakabayashi K, Baba M, Yagihashi S, Tomiyama M. Clinical Utility of Skin Biopsy in Differentiating between Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Parkinsons Dis*. 2015;2015:167038
- [120] Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology*. 2013 Oct 29;81(18):1604-10
- [121] Gibbons CH, Garcia J, Wang N, Shih LC, Freeman R. The diagnostic discrimination of cutaneous α -synuclein deposition in Parkinson disease. *Neurology*. 2016 Aug 2;87(5):505-12
- [122] Rodríguez-Leyva I, Chi-Ahumada EG, Carrizales J, Rodríguez-Violante M, Velázquez-Osuna S, Medina-Mier V, Martel-Gallegos MG, Zarazúa S, Enríquez-Macías L, Castro A, Calderón-Garcidueñas AL, Jiménez-Capdeville ME. Parkinson disease and progressive supranuclear palsy: protein expression in skin. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Feb 1;3(3):191-9
- [123] Donadio V, Incensi A, Piccinini C et al. Skin nerve misfolded α -synuclein in pure autonomic failure and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2016; 79:306-316

- [124] Donadio V, Incensi A, Cortelli P, Giannoccaro MP, Jaber MA, Baruzzi A, Liguori R. Skin sympathetic fiber α -synuclein deposits: a potential biomarker for pure autonomic failure. *Neurology*. 2013 Feb 19;80(8):725-32
- [125] Donadio V, Incensi A, Rizzo G, Capellari S, Pantieri R, Stanzani Maserati M, Devigili G, Eleopra R, Defazio G, Montini F, Baruzzi A, Liguori R. A new potential biomarker for dementia with Lewy bodies: Skin nerve α -synuclein deposits. *Neurology*. 2017 Jul 25;89(4):318-326
- [126] Navarro-Otano J, Casanova-Mollà J, Morales M, Valls-Solè J, Tolosa E. Cutaneous autonomic denervation in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 2015; 122:1149-1155
- [127] Doppler K, Jentschke HM, Schulmeyer L, Vadasz D, Janzen A, Luster M, Höffken H, Mayer G, Brumberg J, Booij J, Musacchio T, Klebe S, Sittig-Wiegand E, Volkmann J, Sommer C, Oertel WH. Dermal phospho- α -synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2017 Apr;133(4):535-545
- [128] Antelmi E, Donadio V, Incensi A, Plazzi G, Liguori R. Skin nerve phosphorylated α -synuclein deposits in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*. 2017 May 30;88(22):2128-2131
- [129] Donadio V. Skin nerve α -synuclein deposits in Parkinson's disease and other synucleinopathies: a review. *Clin Auton Res*. 2018 Nov 30
- [130] Donadio V, Incensi A, Rizzo G, Scaglione C, Capellari S, Fileccia E, Avoni P, Liguori R. Spine Topographical Distribution of Skin α -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017; 76:384-389
- [140] Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov Disord*, 2003;18(7):738-50
- [141] Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, Evans DA. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med*. 1996 Jan 11;334(2):71-6
- [142] Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Nelson J, Markesbery W, Davis D, Hardman J, Launer L, Masaki K, Tanner CM, White LR. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol*. 2004 Oct;56(4):532-9
- [143] Boeve BF, Molano JR, Ferman TJ, Lin SC, Bieniek K, Tippmann-Peikert M, Boot B, St Louis EK, Knopman DS, Petersen RC, Silber MH. Validation of the Mayo Sleep Questionnaire to screen for REM sleep behavior disorder in a community-based sample. *J Clin Sleep Med*. 2013 May 15;9(5):475-80.
- [144] Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Oct;30(12):1591-601.

[145] Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Mizusawa H, Murayama S. Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 May;66(5):354-62