



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**ANALISI COMPUTERIZZATA DELLA CONNETTIVITA'
INTEREMISFERICA FUNZIONALE E STRUTTURALE NEL RESTING
STATE**

**COMPUTERIZED ANALYSIS OF FUNCTIONAL AND STRUCTURAL
INTERHEMISPHERIC CONNECTIVITY IN THE RESTING STATE**

Relatore:
Prof.ssa **Laura Burattini**

Rapporto Finale di:
Rachele Spadoni

Correlatore:
Dott.ssa **Ilaria Marcantoni**

A.A. 2021/2022

Abstract

La Risonanza Magnetica funzionale (fMRI) è una tecnica che fa parte dell'Imaging di Risonanza Magnetica: la sua comparsa risale ai primi anni Novanta quando si riuscirono ad ottenere delle immagini di Risonanza Magnetica contenenti informazioni sull'attività cerebrale.

Lo scopo di questo elaborato è, innanzitutto, quello di illustrare alcune delle principali tecniche di analisi di connettività funzionale e strutturale in resting state: tramite le prime si possono ottenere delle mappe di attivazione cerebrale che mostrano quali aree corticali cooperano insieme nell'attività basale del cervello, mentre con le seconde è possibile ricostruire gli andamenti dei fasci di fibre assoniche nei due emisferi cerebrali. E inoltre, di descrivere i principali software esistenti in fase di pre-processing che sono in grado di normalizzare le immagini di Risonanza Magnetica e di renderle conformi ad uno spazio standard per poterle poi tra di loro confrontare ed integrare.

Un aspetto importante ed essenziale per comprendere gli studi di fMRI è l'anatomia della corteccia cerebrale e in particolare la sua suddivisione in aree corticali; ciascuna area corticale svolge una funzione specifica che può riguardare lo svolgimento di compiti motori, somatosensoriali o di funzioni superiori come il linguaggio e la memoria. Inoltre, è stato osservato, che alcune aree cerebrali, seppur spazialmente distanti, cooperano nello svolgimento di una stessa funzione, a evidenziare la presenza di una connessione tra esse; di qui l'importanza di alcuni concetti come la specializzazione funzionale o l'integrazione funzionale che hanno poi portato alla definizione di connettività funzionale. La specializzazione funzionale presuppone che specifiche regioni cerebrali svolgano specifiche elaborazioni dati e considera che questa specializzazione possa essere anatomicamente segregata su aree corticali differenti, l'integrazione funzionale, invece, si occupa di indagare come queste aree corticali lavorano insieme per elaborare informazioni e risposte a determinati stimoli. Oltre alla connettività funzionale, esiste poi la connettività anatomica-strutturale; la connettività anatomica-strutturale fa riferimento alla presenza di fasci di fibre bianche che attraversano l'intero cervello seguendo diverse direzioni spaziali; nell'Imaging di Risonanza Magnetica, la connettività strutturale viene stimata tramite la misura del tensore di diffusione che è sensibile alla diffusione delle molecole d'acqua lungo direzioni specifiche e preferenziali.

Alla base degli studi sulla connettività c'è il segnale di Risonanza Magnetica Nucleare, la Risonanza Magnetica Nucleare dipende dalle diverse proprietà magnetiche dei tessuti umani, e in particolare degli atomi di idrogeno in essi contenuti se sottoposti a dei campi magnetici esterni. In ambito di

Risonanza Magnetica, negli ultimi anni, si è posto sempre maggior interesse allo studio della Risonanza Magnetica funzionale in resting state (rs-fMRI), metodologia che è in grado di localizzare in maniera estremamente precisa l'attività neuronale del cervello in assenza di specifici task; infatti, la rs-fMRI si basa sulle variazioni dell'ossigenazione sanguigna nelle regioni in cui si ha un'attivazione neuronale indotta da stimoli interni e sulle interazioni di tali variazioni con dei campi magnetici esterni.

Esistono numerose tecniche per l'analisi computerizzata dei dati rs-fMRI, come il General Linear Model, l'Analisi delle Componenti Indipendenti e l'Analisi Probabilistica delle Componenti Indipendenti, tramite le quali è possibile risalire, a partire dal segnale registrato e tramite opportune matrici, al segnale originale, ed esistono numerosi software che vengono utilizzati in fase di pre-processing per l'elaborazione, la normalizzazione e la registrazione delle immagini di Risonanza Magnetica; tra questi si possono citare FSL (*FMRIB Software Library*), AFNI (*Analysis of Functional Neuroimages*), FreeSurfer, *ANTs (Advanced Normalization Tools)*, SPM (*Statistical Parametric Mapping*) e BrainVoyager. Ciascuno di essi mette a disposizione una serie di tools e di algoritmi in grado di eseguire diverse operazioni sulle immagini acquisite; alcuni degli algoritmi messi a disposizione dai software sopracitati sono *N3*, di FreeSurfer, per la normalizzazione dell'intensità, *BET* di FSL e *AUTORECONI* di FreeSurfer, per la rimozione dello scalpo, *MCFLIRT* di FSL per la correzione dei movimenti del capo e *FLIRT* e *FNIRT*, sempre di FSL, per la normalizzazione spaziale delle immagini.

Tramite Risonanza Magnetica funzionale in resting state è possibile localizzare diverse reti cerebrali, dette Resting State Networks (RSNs), che cooperano insieme nello svolgimento dell'attività neuronale basale del cervello e la cui osservazione si è rilevata particolarmente interessante e utile nello studio di patologie demielinizzanti e di disturbi psichici; infatti, alterazioni alle RSNs sono state individuate in malattie come l'Alzheimer, la sclerosi multipla, la schizofrenia, l'autismo, l'epilessia e la sindrome da deficit di attenzione e iperattività.

Indice

Introduzione	I
Capitolo 1: Anatomia funzionale del cervello	1
1.1 I lobi cerebrali	1
1.2 La corteccia cerebrale	2
1.3 Aree corticali	4
1.3.1 Aree di Brodmann	4
1.3.2 Funzioni di aree corticali specifiche	5
1.3.3 Aree associative	6
Capitolo 2: Connettività.....	9
2.1 Specializzazione funzionale	9
2.2 Integrazione funzionale.....	10
2.3 Connettività anatomica-strutturale	11
2.3.1 DTI-Diffusion Tensor Imaging	11
2.3.2 Diffusione Isotropa e Diffusione Anisotropa	12
2.3.3 Applicazioni	12
2.4 Connettività funzionale.....	14
Capitolo 3: Risonanza Magnetica e applicazioni avanzate	15
3.1 Cenni di Risonanza Magnetica	15
3.1.1 Formazione dell'immagine	20
3.1.2 Acquisizione dell'immagine	23
3.2 Risonanza Magnetica Funzionale: fMRI	24
3.3 Il segnale BOLD	25
3.4 Risonanza Magnetica Funzionale in resting state	26
Capitolo 4: Tecniche di analisi dei dati	29
4.1 General Linear Model	29
4.2 Analisi delle Componenti Indipendenti	31
4.2.1 Probabilistic Independent Component Analysis	34
4.3 Software moderni per l'analisi dei dati fMRI	35
4.4 Pre-processamento dei dati	36
4.4.1 Conversione delle immagini e normalizzazione dell'intensità.....	36
4.4.2 Skull-Strip delle immagini.....	37
4.4.3 Correzione dei movimenti.....	39
4.4.4 Normalizzazione spaziale	40

4.4.5 Coregistrazione	42
Discussioni e Conclusioni.....	III
Bibliografia	V

Introduzione

La Risonanza Magnetica funzionale (fMRI) è una metodica di recente introduzione nel campo dell'Imaging di Risonanza Magnetica (IMG) che permette la localizzazione dell'attività cerebrale con una buona accuratezza temporale e con una risoluzione spaziale millimetrica. Alla base della formazione delle immagini c'è il segnale di Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) proveniente dall'eccitazione, tramite campi magnetici esterni, dei nuclei degli atomi d'idrogeno presenti nelle molecole d'acqua dei tessuti umani e, più in generale, nei composti organici.

Ciò che viene misurato tramite Risonanza Magnetica funzionale è la variazione dell'ossigenazione sanguigna in seguito all'attivazione di alcune aree cerebrali coinvolte in specifiche funzioni motorie o sensoriali, ma anche in funzioni cerebrali superiori come la memoria e il linguaggio, o ancora, in assenza di ciascuna di esse.

In particolare, negli ultimi anni, si è posta maggiore attenzione sulla tecnica di Risonanza Magnetica funzionale in resting state (rs-fMRI) in cui ai soggetti analizzati viene semplicemente chiesto di rimanere fermi e di non pensare a nulla durante l'esecuzione del test; infatti, tale tecnica, che non prevede l'utilizzo di task è, per certi aspetti, migliore della normale Risonanza Magnetica funzionale in quanto, spesso, determinate patologie sono così invalidanti da ostacolare anche i compiti più semplici previsti per specifici task.

L'utilizzo della Risonanza Magnetica funzionale in resting state ricopre un ruolo fondamentale nello studio della connettività funzionale del cervello, definita come la correlazione temporale tra aree cerebrali spazialmente distinte; tramite essa sono state infatti identificate delle reti neuronali, dette Resting State Networks (RSNs), fortemente connesse, le principali delle quali sono: la Default Mode Network, la Visual e l'Auditory Network, l'Executive Control Network, la Frontoparietal Network e la Temporoparietal Network. Le RSNs sono sempre presenti nel cervello umano, sia nello stato di veglia che durante il sonno o sotto anestesia, a dimostrare il fatto che l'attività neuronale spontanea del cervello è sempre presente e svolge un ruolo fondamentale nelle funzioni cerebrali. Inoltre, queste reti funzionali non sono identiche in tutti i soggetti, ma variano in base all'età e alla presenza di eventuali stati patologici, come malattie neurologiche e neurodegenerative, ma anche disturbi psichici.

Sebbene sia utilizzata anche in ambito clinico, la rs-fMRI è una tecnica principalmente usata nel mondo della ricerca; lo scopo principale degli esperimenti di fMRI in resting state è quello di individuare, sia in soggetti sani che in soggetti patologici, le aree del cervello attive in assenza di alcun compito specifico richiesto dall'esterno.

Lo scopo di questo elaborato è quello di illustrare, innanzitutto, la tecnica di Risonanza Magnetica Nucleare, con i relativi metodi di formazione e acquisizione delle immagini, e come, sulla base del segnale di Risonanza Magnetica e delle variazioni dell'ossigenazione sanguigna, si possano ottenere delle mappe di attivazione cerebrale che mostrano quali aree cerebrali cooperano insieme in assenza di specifici task esterni. E successivamente, quello di evidenziare alcune delle principali tecniche di analisi computerizzata dei dati di rs-fMRI e alcuni dei principali software esistenti usati in fase di preprocessing per normalizzare le immagini acquisite e per allinearle a degli spazi standard in modo tale che possano essere tra di loro facilmente confrontate e integrate.

Capitolo 1: Anatomia funzionale del cervello

Il cervello si trova all'interno della scatola cranica e occupa la parte anteriore dell'encefalo, il quale, insieme al midollo spinale, costituisce il Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Il cervello è strutturalmente diviso in diencefalo, che comprende talamo e ipotalamo, e telencefalo, che comprende i due emisferi cerebrali; il cervello è infatti suddiviso in due parti, l'emisfero destro e l'emisfero sinistro, collegati tra loro da un robusto fascio di fibre nervose, il corpo calloso, e separati superficialmente da un solco profondo, la scissura interemisferica.

Gli emisferi cerebrali contengono le aree corticali motorie e sensitive primarie che rappresentano rispettivamente il livello di controllo più alto dell'attività motoria e della proiezione degli stimoli sensitivi.

1.1 I lobi cerebrali

La superficie degli emisferi cerebrali mostra una complessa organizzazione di circonvoluzioni separate da solchi di varia profondità, i solchi assolvono alla funzione anatomica di dividere gli emisferi in lobi (**Figura 1**). I lobi frontale, parietale, temporale e occipitale corrispondono approssimativamente alla superficie delle ossa ad essi sovrastanti, da cui prendono il nome.

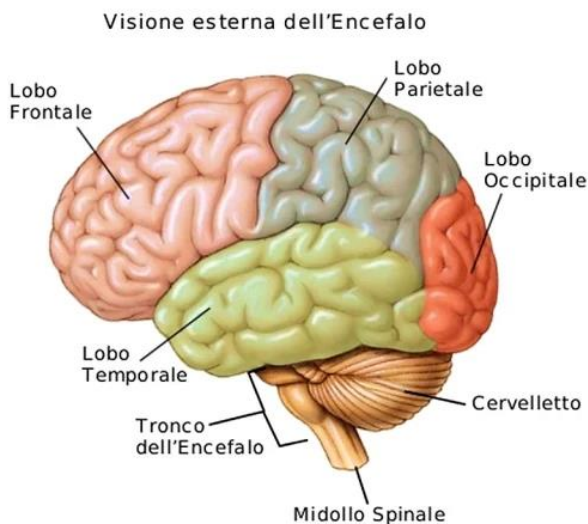


Figura 1 Lobi cerebrali.

Il *lobo frontale* si trova nella parte anteriore dell'emisfero cerebrale; alle aree del lobo prefrontale sono legate le capacità di prestare attenzione, di pianificare eventi per il futuro, di iniziativa, di approfondimento del pensiero e il controllo di alcuni aspetti della personalità.

Nella parte posteriore del lobo frontale sono compresi i centri motori, mentre nella zona posterolaterale ci sono i centri deputati alla produzione e alla comprensione del linguaggio (area di Broca). Il lobo frontale svolge un ruolo importante anche nel controllo delle emozioni e della motivazione, per questo motivo, lesioni a quest'area producono perdita delle inibizioni e dell'autocontrollo e i pazienti diventano del tutto indifferenti alle conseguenze delle proprie azioni. A disfunzioni di questa regione sono attribuiti anche disturbi emotivi, come il disturbo bipolare e il disturbo ossessivo-compulsivo.

Il *lobo temporale* è la porzione di corteccia che si trova al di sotto dei lobi frontale e parietale, da quali è separato per mezzo del solco laterale (di Silvio), i lobi temporali sono necessari per la percezione uditiva, per la comprensione del linguaggio parlato, per i processi mnemonici e per l'affettuosità. I pazienti con lesioni al lobo temporale perdono in genere la capacità di interpretare gli stimoli uditivi non verbali (come per esempio la musica), inoltre, lesioni al lobo temporale interferiscono gravemente con il riconoscimento, la memoria e il linguaggio.

Il *lobo parietale* è quella porzione di corteccia cerebrale posteriore delimitata anteriormente dal giro centrale, posteriormente dal solco parietoccipitale e inferiormente dal solco laterale. In esso sono localizzate le aree della sensibilità somatica: tattile, termica, dolorifica e cinestetica. Nel lobo parietale vengono elaborate informazioni relative al tatto, alla localizzazione degli oggetti nello spazio e all'attenzione verso il campo visivo controlaterale.

Il *lobo occipitale* corrisponde alla parte posteriore del cervello, il suo limite anteriore è costituito dalla scissura calcarina, contiene i centri dell'area visiva primaria e le aree per l'integrazione psichica e motoria della visione che consentono il riconoscimento degli oggetti visualizzati. Lesioni alla corteccia visiva primaria conducono ad una forma di cecità corticale, le crisi epilettiche che coinvolgono il lobo occipitale possono determinare allucinazioni visive che spesso consistono in linee o reti di colore sovrapposte nel campo visivo controlaterale [1].

1.2 La corteccia cerebrale

La corteccia cerebrale è il caratteristico strato di sostanza grigia che ricopre l'intera superficie esterna del cervello, è costituita da un sottile strato di neuroni ed ha uno spessore compreso tra 2 e 5 mm; si stima che l'intera corteccia cerebrale contenga circa 30 miliardi o più di neuroni.

È all'enorme complessità di questa struttura che si devono le nostre capacità sensoriali, motorie e percettive, le funzioni superiori come il linguaggio, la memoria, la coscienza, la logica, la previsione delle conseguenze delle nostre azioni, la creatività e così via, ma anche tutte quelle funzioni che permettono l'adattabilità della nostra specie all'ambiente in cui viviamo.

Istologicamente, la corteccia cerebrale presenta una caratteristica disposizione in strati delle fibre e dei diversi tipi cellulari che la compongono (**Figura 2**).

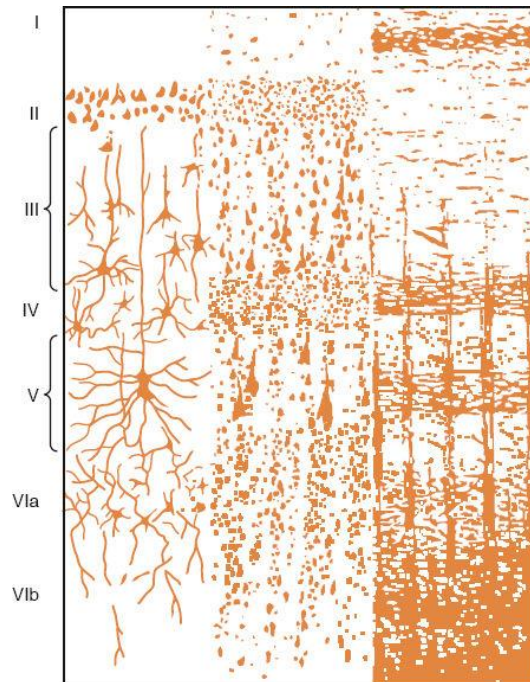


Figura 2 Struttura della corteccia cerebrale, sono illustrati i seguenti strati: I, strato molecolare; II, strato granulare esterno; III, strato esterno delle cellule piramidali, IV; strato granulare interno; V, strato interno delle grandi cellule piramidali; VI, strato delle cellule fusiformi [2].

Le cellule che costituiscono la corteccia cerebrale sono di tre tipi: *granulari*, *fusiformi* e *piramidali*. Le *cellule dei granuli* sono di piccole-medie dimensioni e hanno assoni brevi, funzionano come interneuroni corticali che trasmettono i loro segnali a breve distanza; possono essere sia eccitatorie che inibitorie: la maggior parte di quelle eccitatorie sintetizza e libera il glutammato, un neurotrasmettitore eccitatorio, mentre la gran parte di quelle con funzione inibitoria sintetizza e libera acido γ -amminobutirrico (GABA).

Le aree sensoriali della corteccia cerebrale contengono un numero elevato di cellule dei granuli e questo suggerisce che i segnali sensoriali in arrivo a queste aree subiscono un elevato grado di elaborazione.

Le *cellule piramidali*, che sono più grandi e più numerose di quelle fusiformi, danno origine alle fibre di grosso calibro che raggiungono il midollo spinale e alla maggior parte delle fibre commissurali che consentono l'innervazione reciproca tra le aree corticali dei due emisferi.

La parte destra della **Figura 2** mostra la tipica organizzazione delle fibre nei sei strati della corteccia cerebrale: da una parte le fibre orizzontali che si estendono tra aree corticali adiacenti, dall'altra le fibre verticali che decorrono nella corteccia cerebrale, la percorrono in ingresso e in uscita e mettono in contatto le diverse aree della corteccia cerebrale con le strutture sottocorticali.

È bene sottolineare che la massima parte dei segnali sensoriali specifici in arrivo alla corteccia termina nello strato IV, mentre la massima parte dei segnali in uscita lascia la corteccia cerebrale tramite i neuroni situati negli strati V e VI.

I neuroni e le fibre degli strati I, II e III della corteccia cerebrale sono connessi tra loro e coinvolti nei processi di elaborazione dei segnali provenienti da più aree corticali e costituiscono pertanto il substrato neurale alla base dei compiti di associazione [2].

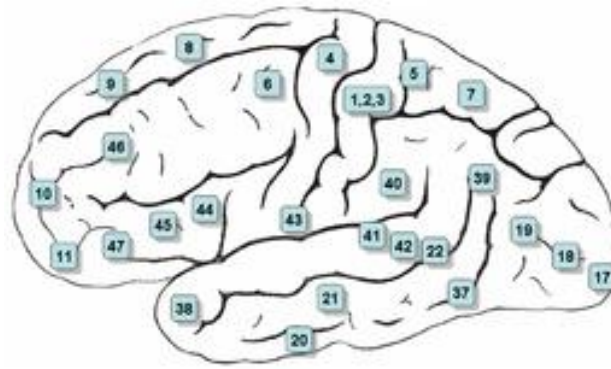
1.3 Aree corticali

1.3.1 Aree di Brodmann

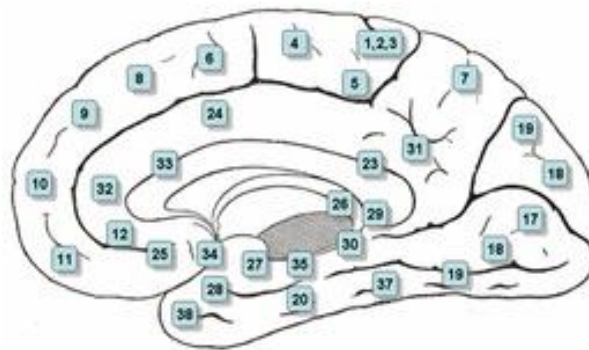
Un'area di Brodmann è una regione della corteccia cerebrale definita in base alla sua citoarchitettura, o organizzazione di cellule cerebrali, e fibre nervose; furono chiamate così per via della classificazione operata dal neurologo tedesco Korbinian Brodmann all'inizio del XX secolo.

Brodmann realizzò la mappa della corteccia cerebrale intorno al 1909, in essa distinse fino a 52 aree cerebrali diverse, basandosi sull'organizzazione dei neuroni che si poteva osservare al microscopio ottico nella corteccia cerebrale usando la colorazione di Nissl (**Figura 3**).

Le aree di Brodmann sono state discusse, dibattute, raffinate e rinominate in modo esauriente per circa un secolo, e rimangono ad oggi il sistema di organizzazione della corteccia cerebrale umana più ampiamente noto e citato [3].



(a)



(b)

Figura 3 Aree di Brodmann: superficie laterale del cervello (a) e superficie mediale (b); in entrambe sono mostrate tramite numeri le diverse aree di Brodmann [3].

1.3.2 Funzioni di aree corticali specifiche

Diversi studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che alcune funzioni corticali sono compartimentalizzate, questo significa che a diverse aree corticali corrispondono diverse funzioni. Nella **Figura 4** è riportata una mappa schematica delle funzioni di alcune aree corticali ottenuta mediante stimolazioni elettriche della corteccia in pazienti affetti da lesioni o ablazioni di specifiche regioni corticali, la figura illustra le aree corticali motorie (motoria primaria, premotoria e supplementare) e le aree sensoriali (primarie e secondarie) somatiche, visive e uditive.

Le aree motorie primarie sono, direttamente o indirettamente, in rapporto funzionale con i muscoli da esse innervati e la loro attivazione produce contrazioni muscolari. Le aree sensoriali primarie - visive, uditive e somatiche - ricevono e decodificano gli stimoli somestesici, uditivi, visivi, gustativi e olfattivi provenienti direttamente dagli organi di senso [2].

Le aree secondarie non hanno una rappresentazione somatotopica e conferiscono significato alle funzioni delle rispettive aree primarie, ad esempio, le aree premotoria e supplementare cooperano con

la corteccia motoria primaria per elaborare il programma motorio e controllare l'esecuzione degli atti motori complessi. Le aree sensoriali secondarie, che si trovano a pochi centimetri da quelle primarie, svolgono un ruolo importante nell'analisi dei segnali sensoriali specifici, vale a dire: nell'interpretazione delle afferenze tattili che ci consentono di definire la forma e il materiale che costituiscono un oggetto; nell'analisi della definizione del colore, dell'intensità della luce, della direzione delle fonti di luce, e infine nell'interpretazione del significato dei suoni in relazione al tono, alla frequenza, all'ampiezza e alla sequenza [2].

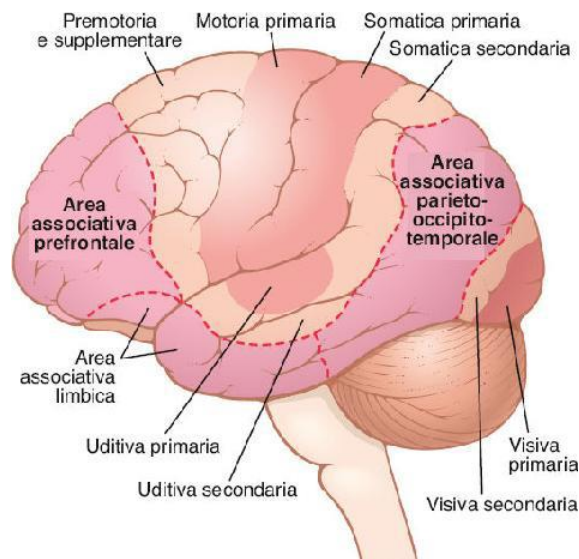


Figura 4 Le principali aree corticali della corteccia cerebrale, le aree motorie primaria e secondaria, le aree sensoriali e le aree associative [2].

1.3.3 Aree associative

La **Figura 4** mostra anche le aree della corteccia cerebrale che non possono essere classificate come aree motorie o sensoriali, primarie o secondarie, e che sono dette *aree associative* perché ricevono e analizzano i segnali che contemporaneamente giungono a esse dalle aree motorie e sensoriali, ma anche dalle strutture sottocorticali.

Anche le aree associative possiedono alcune caratteristiche che le distinguono le une dalle altre; importanti aree associative sono: l'area *parieto-occipito-temporale*, l'area *prefrontale* e l'area *limbica*.

L'*area associativa parieto-occipito-temporale* si trova nello spazio corticale tra l'area parietale e quella occipitale ed è delimitata anteriormente dalla parete somatosensoriale, posteriormente dalla corteccia visiva e lateralmente dalla corteccia uditiva.

Quest'area è di fondamentale importanza per interpretare e dare un significato ai segnali provenienti dalle aree sensoriali; tuttavia, anch'essa presenta una suddivisione funzionale come mostrato in **Figura 5**.

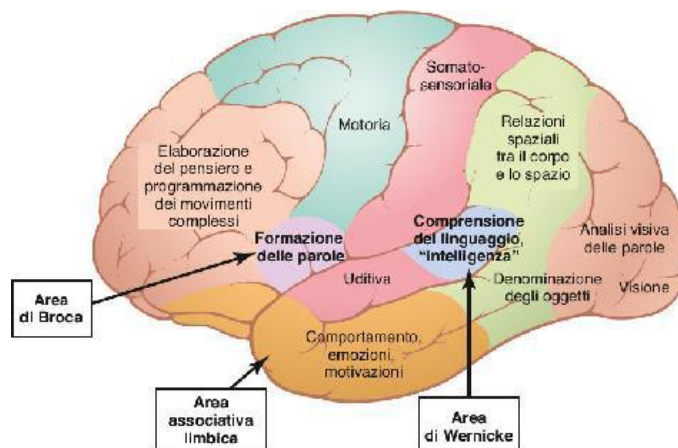


Figura 5 Mappa delle aree funzionali specifiche della corteccia cerebrale [2].

L'area corticale che si estende dalla corteccia occipitale superiore alla corteccia parietale posteriore ha il compito di analizzare in tempo reale la posizione del corpo nello spazio (propriocezione).

L'area del Wernicke è la più importante area corticale deputata alla comprensione del linguaggio, giace nella parte posteriore del lobo temporale superiore, posteriormente alla corteccia uditiva, è un'area di fondamentale importanza per l'espressione delle funzioni intellettive superiori, la maggior parte delle quali è basata sulla funzione linguistica.

L'area del giro angolare è necessaria per la comprensione della parola scritta, si trova posteriormente all'area deputata alla comprensione del linguaggio, in una parte di corteccia compresa nella regione anterolaterale del lobo occipitale. Quest'area è estremamente importante per comprendere e dare un significato alle parole percepite attraverso la vista, cioè le parole scritte; una lesione a quest'area comporta una perfetta comprensione del linguaggio parlato ma non di quello scritto.

Tra la porzione più laterale del lobo occipitale anteriore e la porzione posteriore del lobo temporale è situata l'area per la definizione dei nomi e degli oggetti.

L'area associativa prefrontale è strettamente associata e collegata con le aree motorie primarie per pianificare la trama e la sequenza degli atti motori complessi.

L'area associativa prefrontale è anche determinante per i processi di elaborazione mentale del pensiero; la corteccia prefrontale è infatti in grado di elaborare le modalità relative alla genesi del pensiero e viene frequentemente descritta come serbatoio per la memoria di lavoro a breve termine.

L'area di Broca è localizzata in parte, nell'area posterolaterale della corteccia prefrontale, in parte nella corteccia premotoria, è qui che vengono pianificati i pattern motori utilizzati per la pronuncia di singole parole o di brevi frasi in quanto quest'area controlla la sinergia dell'attivazione dei muscoli della laringe, dei muscoli respiratori e di quelli della bocca. L'area di Broca opera in stretta associazione con l'area di Wernicke.

Le **Figure 4 e 5** mostrano anche *l'area associativa limbica* posizionata nella porzione anteriore del lobo temporale, quest'area è implicata nel controllo del comportamento, delle emozioni e delle motivazioni. La corteccia limbica prende parte, insieme a un numero considerevole di aree sottocorticali, a un sistema corticale molto esteso definito sistema limbico, sede dell'origine delle spinte emozionali e motivazionali che sono alla base dei processi di apprendimento [2].

Capitolo 2: Connettività

La connettività è definibile come il risultato dell'interazione tra fattori genetici, epigenetici e meccanismi dipendenti dall'esperienza, ed è inoltre responsabile delle connessioni create all'interno del cervello.

Lo sviluppo delle connessioni cerebrali varia durante la vita di un individuo: nell'utero l'elemento predominante è quello genetico, mentre dopo la nascita le connessioni sono progressivamente rifinite e rimodellate grazie ai meccanismi di plasticità dovuti agli stimoli esterni e all'esperienza. Questi cambiamenti perdurano fino all'età adulta e questa continua riorganizzazione delle connessioni va a definire le caratteristiche comportamentali e di apprendimento durante tutta la vita [4].

Fisiologicamente esistono due fattori principali che determinano la connettività: la plasticità cellulare, che caratterizza la neurogenesi nell'encefalo in via di sviluppo e la plasticità sinaptica, che fa riferimento all'intensità delle connessioni sinaptiche.

La distribuzione delle funzioni e delle connessioni nell'encefalo umano è, comunque, ancora sconosciuta per molti aspetti, differenti teorie interpretative e metodologie di analisi sono state sviluppate nel corso degli anni.

2.1 Specializzazione funzionale

Il concetto di specializzazione funzionale presuppone che specifiche regioni cerebrali svolgano specifiche elaborazioni dati, ma considera anche la possibilità che questa specializzazione possa essere anatomicamente segregata su aree corticali differenti.

Il principio in base al quale vengono distinte e individuate le differenti regioni specializzate è quello della segregazione funzionale, principio che ha guidato, all'inizio del ventesimo secolo, il neurologo tedesco Brodmann per la distinzione di 52 differenti aree sulla corteccia cerebrale umana, avente ognuna una funzione diversa. Recenti studi inducono a considerare la segregazione funzionale come un principio cardine dell'organizzazione corticale e a ritenere che sia possibile suddividere il cervello in un numero di zone funzionali diverse ancora maggiore rispetto a quello identificato da Brodmann [5].

Infine, è bene specificare che ciò che è localizzato nelle singole regioni cerebrali non è un gruppo di facoltà mentali complesse, ma un insieme di operazioni elementari, le facoltà complesse derivano

dalle connessioni reciproche di molteplici aree cerebrali e anzi, anche il compito cognitivo più semplice richiede l'azione coordinata di diverse aree cerebrali distinte [5].

2.2 Integrazione funzionale

L'integrazione funzionale è lo studio di come le regioni del cervello lavorano insieme per elaborare informazioni e risposte a determinati stimoli. Sebbene l'integrazione funzionale si basi, in gran parte, sulla conoscenza anatomica delle connessioni tra le aree cerebrali, l'enfasi è su come grandi gruppi di neuroni si attivano insieme in seguito a vari stimoli.

Il primo a proporre un'analisi sull'integrazione funzionale all'interno del cervello fu Karl Wernicke, nel 1876: studiando i problemi del linguaggio egli nota un particolare tipo di afasia dovuta a lesioni nella zona di connessione tra il lobo temporale, il lobo parietale e quello occipitale, e non dal danneggiamento di una specifica area del linguaggio, come invece avveniva nei pazienti di Broca. Nello specifico, quest'afasia differisce da quella individuata da Broca, in cui i pazienti riescono a comprendere ma non a parlare, per il fatto che i pazienti di Wernicke sono in grado di parlare, ma non di capire. Da qui l'intuizione che soltanto le funzioni cognitive più elementari, in rapporto con attività sensomotorie semplici, siano localizzate in aree corticali circoscritte e che le interconnessioni tra queste aree funzionali rendano possibile lo svolgimento delle funzioni intellettuali più complesse [5].

Il ruolo di primaria importanza svolto dall'integrazione funzionale fra diverse aree specializzate, coinvolte nello stesso task, si può notare anche considerando la loro posizione reciproca, ad esempio, per quanto riguarda le regioni interessate nell'espressione del linguaggio Wernicke ipotizza che l'area di Broca sia responsabile dell'aspetto motorio che coordina i movimenti della bocca, necessari per sviluppare un discorso coerente. Nella **Figura 5** si può notare come questa sia situata immediatamente davanti all'area motoria che controlla bocca, lingua, palato e corde vocali, e cioè in una posizione ottimale per comunicare con le aree la cui funzione è strettamente connessa alle finalità della prima. Ad oggi è noto, inoltre, che anche regioni anatomicamente distanti cooperano tra loro al fine di realizzare uno specifico compito, sia quelle coinvolte nel linguaggio, che quelle responsabili di un compito motorio [5].

Lo studio della connettività tra le diverse regioni cerebrali assume, quindi, un ruolo di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi che sottostanno all'elaborazione dell'informazione

nel cervello. Per l'analisi delle tecniche di neuroimaging si possono distinguere tre differenti tipi di connettività: anatomica-strutturale, funzionale ed effettiva.

2.3 Connettività anatomica-strutturale

La connettività anatomica-strutturale fa riferimento alla presenza di connessioni assoniche: la distribuzione di fasci di fibre bianche viene stimata, in Risonanza Magnetica, tramite la misurazione del Diffusion Tensor Imaging (DTI), il tensore di diffusione è sensibile alla diffusione delle molecole d'acqua lungo una direzione specifica; poiché la diffusione ha come ostacolo le membrane delle cellule, alcune regioni del cervello che presentano strutture cellulari altamente organizzate, mostrano una diffusione fortemente anisotropa rispetto ad altre aree cerebrali [6]. La direzione diffusiva delle molecole d'acqua permette di valutare l'orientamento delle fibre e di ricostruirne l'andamento.

Si può pensare alla connettività strutturale come ad una sorta di cinematica delle connessioni cerebrali, nel senso che permette di stabilire e quantificare come due diverse aree dell'encefalo siano collegate e possano scambiarsi informazioni in maniera più o meno efficiente, ma senza indagare le ragioni di questi collegamenti.

2.3.1 DTI-Diffusion Tensor Imaging

La tecnica di Risonanza Magnetica basata sulla misura del Tensore di Diffusione permette di sensibilizzare l'intensità del segnale di Risonanza Magnetica al processo di diffusione delle molecole d'acqua all'interno dei tessuti. Tale tecnica fornisce gli strumenti per quantificare il grado di anisotropia delle diverse regioni del tessuto indagato e, tramite la stima della principale direzione di diffusione delle molecole d'acqua all'interno di ciascun voxel¹, ci permette di osservare le caratteristiche spaziali delle principali strutture eventualmente presenti.

All'interno di un campione di un fluido qualsiasi le molecole sono soggette ad un continuo moto casuale di origine termica, questo fenomeno prende il nome di moto Browniano, dal nome del botanico scozzese Robert Brown (1773-1858) che per primo lo osservò e ne descrisse le caratteristiche [7]. Il moto di ciascuna molecola all'interno del fluido risulta indipendente dal comportamento delle altre molecole, tuttavia, le collisioni tra le molecole provocano reciproci

¹ Il voxel è la controparte tridimensionale del pixel bidimensionale; in particolare, in radiologia, un voxel è ciascuno dei volumi elementari identici in cui viene scomposto il corpo in esame o una sua immagine tridimensionale.

spostamenti, di natura casuale e senza una direzione preferenziale, che danno luogo al fenomeno della diffusione.

Sebbene il fenomeno della diffusione sia il risultato di processi casuali, esso è governato da un meccanismo guida che presenta caratteristiche dipendenti dalla natura del campione e dalla sua temperatura. Nel caso di liquidi di diversa natura la diffusione dell'uno all'interno dell'altro è descritta in termini del gradiente di concentrazione della sostanza che diffonde.

Nei tessuti biologici, invece, il fenomeno di diffusione al quale si è interessati e che viene sfruttato per l'imaging in ambito clinico, è rappresentato dal comportamento delle molecole dell'acqua in acqua, pertanto prende il nome di auto-diffusione. Il fenomeno dell'auto-diffusione descrive il comportamento di una molecola all'interno di un fluido omogeneo ed è provocato dall'agitazione termica delle molecole piuttosto che da gradienti di concentrazione.

2.3.2 Diffusione Isotropa e Diffusione Anisotropa

La diffusione di una particella all'interno di un fluido dipende dalle caratteristiche del mezzo in cui diffonde. L'eventuale presenza di ostacoli e di barriere, infatti, influenza il processo di diffusione della particella, determinando diverse tipologie di diffusione all'interno di un mezzo. In generale, si parla di diffusione isotropa quando il mezzo in cui avviene il processo di diffusione non presenta alcuna direzione privilegiata per il processo stesso, in questi casi il mezzo viene detto isotropo. In un fluido puro, ovvero in assenza di corpi estranei, la diffusione di una particella viene definita diffusione libera.

All'interno dei tessuti organici le membrane cellulari, le macromolecole, le catene proteiche e i fasci di fibre muscolari e cerebrali rappresentano ostacoli e barriere al processo di diffusione delle molecole di acqua; in presenza di ostacoli e barriere con una particolare organizzazione strutturale la diffusione delle particelle differisce a seconda delle direzioni nello spazio, in questi casi si parla di diffusione anisotropa. In ambito neurologico, la presenza di fasci di fibre compatte rappresentate dagli assoni neuronali della materia bianca rende la diffusione delle molecole di acqua fortemente anisotropa [8].

2.3.3 Applicazioni

Le principali applicazioni del tensore di diffusione sono quelle che coinvolgono la visualizzazione della sostanza bianca, per determinare la localizzazione, l'orientamento, e l'anisotropia dei fasci di

fibre nervose. L'architettura dei gruppi di assoni in fasci paralleli e le loro guaine di mielina, facilitano la diffusione delle molecole d'acqua preferenzialmente lungo la loro principale direttrice.

Se viene applicata una serie di gradienti di diffusione, cioè variazioni del campo magnetico statico, in maniera che si possano ottenere almeno tre vettori direzionali, è possibile calcolare, per ogni voxel, un tensore e quindi definire una matrice simmetrica positiva che descrive la forma tridimensionale della diffusione delle molecole d'acqua; la direzione delle fibre viene indicata dall'autovettore principale del tensore.

Ciascun vettore può, inoltre, ricevere una codifica a colori, permettendo in questo modo di visualizzare la posizione e la direzione dei vari fasci di fibre: il colore rosso corrisponde al vettore direzionale dell'asse interemisferico, il blu a quello dell'asse ventro-caudale e infine il verde a quello dell'asse antero-posteriore, un esempio di immagini del cervello acquisite tramite Risonanza Magnetica con DTI è mostrata in **Figura 6**.

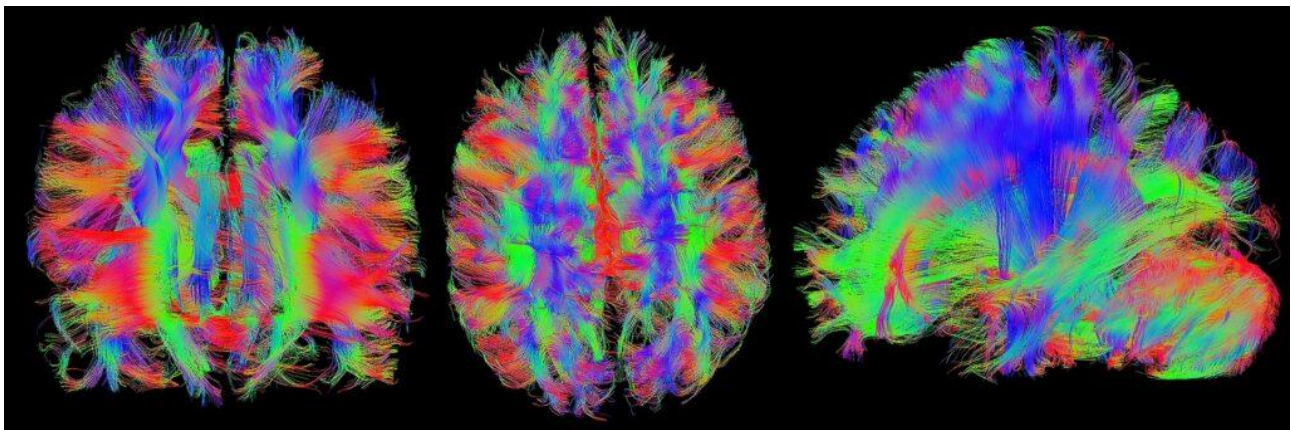


Figura 6 Visioni frontale, trasversale e sagittale di una trattografia eseguita tramite DTI. I principali fasci di fibre di sostanza bianca vengono visualizzati in modo tridimensionale tramite particolari software di ricostruzione. I diversi colori corrispondono ai vettori direzionali che individuano il decorso di ciascuna fibra secondo l'asse interemisferico (rosso), ventro-caudale (blu) e antero-posteriore (verde) [9].

La Risonanza Magnetica con tensore di diffusione può essere utilizzata per eseguire una trattografia, cioè una ricostruzione dei percorsi delle fibre nervose all'interno della sostanza bianca. L'analisi di integrità della sostanza bianca si rivela utile in caso di patologie demielinizzanti come la malattia di Alzheimer e alcune forme di tumore cerebrale. Inoltre, questo tipo di risonanza magnetica può essere impiegata nello studio dello sviluppo del cervello durante l'infanzia e l'adolescenza; alterazioni della sostanza bianca sono poi collegate all'autismo, alla sindrome da deficit di attenzione e iperattività, alle psicosi e all'abuso di sostanze stupefacenti e di alcol [10].

2.4 Connettività funzionale

La connettività funzionale è definita come la correlazione temporale del segnale in due o più regioni anatomicamente distinte e spazialmente remote [11].

Il concetto di base è che la somiglianza degli andamenti temporali del segnale nelle diverse aree cerebrali suggerisce che le stesse siano in costante comunicazione e che formino delle reti neuronali dette Resting State Networks (RSNs). Tra le tecniche di neuroimmagini, la Risonanza Magnetica funzionale in resting state (rs-fMRI) è sicuramente ideale nello studio della connettività funzionale perchè grazie a un'elevata risoluzione spaziale permette di discriminare tali networks.

Lo studio della connettività funzionale con rs-fMRI rende possibile evidenziare le regioni che variano simultaneamente la loro attivazione, con l'assunto che la variazione simultanea di attivazione rifletta un coinvolgimento nello svolgere una determinata funzione; regioni che modulano simultaneamente la loro attivazione si dicono funzionalmente connesse.

Inoltre, la relativa facilità di acquisizione dei dati in esami di fMRI in resting state (in cui i pazienti non devono svolgere alcun compito) la rende adatta ad essere utilizzata in ambito clinico dove spesso le patologie più invalidanti pregiudicano l'esecuzione di compiti anche facili.

Le prove più significative dell'esistenza delle RSNs risiede nella riproducibilità delle reti nel singolo soggetto, nella consistenza delle reti tra soggetti diversi e nella corrispondenza delle aree corticali individuate con diversi metodi di studio.

Per studiare la connettività funzionale esistono numerose metodologie che si dividono essenzialmente tra quelle *frequency based* e quelle *time-series based*; il primo raggruppamento si compone dell'analisi di coerenza e dello studio della funzione di trasferimento, il secondo, invece, prevede l'ulteriore suddivisione tra misure lineari e non lineari, ossia tra ipotesi di gaussianità e non gaussianità dei dati. Tramite le misure lineari si analizza la cross-correlazione tra le serie temporali, mentre nel caso non lineare viene valutata la mutua informazione o la sincronizzazione. Tra i metodi più applicati per studiare la connettività funzionale, nel caso di serie temporali non gaussiane, si possono citare la Principal Component Analysis (PCA) e l'Independent Component Analysis (ICA) [12].

Capitolo 3: Risonanza Magnetica e applicazioni avanzate

3.1 Cenni di Risonanza Magnetica

La Risonanza Magnetica (RM) è una tecnica che permette di acquisire immagini anatomiche o funzionali di regioni del nostro corpo sfruttando le proprietà nucleari di alcuni atomi sottoposti a dei campi magnetici.

Alla base del fenomeno c'è la capacità di alcuni nuclei atomici di assorbire energia quando sono immersi in un campo magnetico uniforme, tale capacità è influenzata dal numero di protoni nel nucleo degli elementi in questione: sono eccitabili gli atomi con un numero dispari di protoni.

Il segnale di Risonanza Magnetica, nel normale uso clinico, dipende dai protoni d'idrogeno dell'acqua contenuta nei tessuti, mentre l'intensità dell'immagine dipende dalla densità dei protoni.

La proprietà che permette ad un nucleo atomico di interagire con un campo magnetico esterno è lo spin intrinseco, cioè un fenomeno quantistico per il quale il nucleo viene visto come una pallina che può ruotare intorno al proprio asse (**Figura 7**).

Il protone, come le altre particelle atomiche, oltre alle proprietà magnetiche, è dotato di carica elettrica e pertanto, ha proprietà e comportamenti che possono essere paragonati a quelli di un dipolo magnetico. Questo dipolo è caratterizzato da un momento magnetico μ e da un momento angolare s , ciò che lega il momento magnetico e quello angolare è il rapporto giromagnetico γ , il rapporto giromagnetico è una costante caratteristica dell'atomo in questione, per l'idrogeno $\gamma = 42.58 \text{ MHz/T}$.

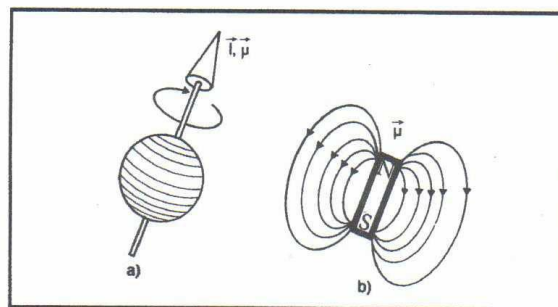


Figura 7 (a) nucleo visto come una pallina in rotazione rispetto al suo asse. (b) Nucleo rappresentato come un dipolo magnetico.

In assenza di campi magnetici esterni applicati, i vari dipoli sono orientati casualmente nello spazio e la loro somma vettoriale è nulla. Viceversa, in seguito all'applicazione di un campo magnetico esterno statico B_0 (di sufficiente intensità, $B_0 > 0.5$ T), i dipoli magnetici dei protoni tendono ad allinearsi in direzione di tale campo, assumendo verso parallelo (spin-up) o antiparallelo (spin-down) ad esso. Questo orientamento dipende dall'energia dei nuclei stessi in quanto i versi spin-up e spin-down rappresentano due condizioni energetiche differenti, rispettivamente a bassa ed alta energia.

Complessivamente, l'insieme dei nuclei forma una magnetizzazione macroscopica M_0 avente come direzione e verso quelli di B_0 e come risultante la somma vettoriale di tutti i dipoli; questo fa sì che le componenti lungo le tre direzioni spaziali di M siano: $M_z \neq 0$, e $M_{xy} = 0$.

Aumentando l'intensità di B_0 , cresce, proporzionalmente, anche quella di M_0 con conseguente aumento della qualità del segnale utile per le immagini RM. Quindi, questi nuclei, che già possiedono un movimento di rotazione intorno al proprio asse, acquistano un altro moto rotazionale lungo la superficie di un cono ideale costruito attorno all'asse caratteristico della direzione del campo magnetico B_0 .

Ogni nucleo si può ora paragonare ad una particella rotante attorno al proprio asse e dotata di momento magnetico μ , che è in moto di precessione con velocità angolare ω_0 attorno alla direzione del campo magnetico statico B_0 , cioè z . Quello che si verifica è un moto di precessione di tutti i momenti magnetici μ attorno a B_0 con frequenza di precessione $\Omega_0 = \omega_0 / 2\pi$, direttamente proporzionale, tramite la costante γ , all'intensità di B_0 ; per la Legge di Larmor: $\Omega_0 = \gamma B_0$, dove la quantità Ω_0 prende il nome di frequenza di Larmor (**Figura 8**).

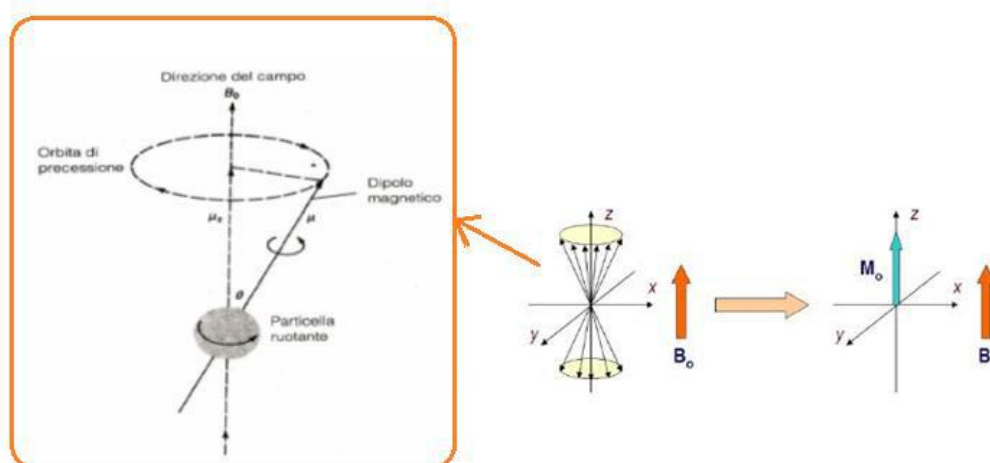


Figura 8 Rappresentazione del moto di precessione dei nuclei di idrogeno e rappresentazione grafica del vettore di magnetizzazione netta M_0 .

La condizione indispensabile affinché si verifichi il fenomeno di risonanza magnetica è che deve essere perturbata la condizione di equilibrio creata da B_0 , si perturba il sistema con un impulso a radiofrequenza (RF) specifica, cioè a frequenza uguale a quella di precessione dei protoni di idrogeno, e se ne studia il ritorno allo stato di equilibrio. L'impulso a RF è un campo magnetico variabile B_1 perpendicolare a B_0 , rotante intorno a quest'ultimo alla frequenza di Larmor Ω_0 . Se i nuclei magnetizzati (allineati a B_0) sono sottoposti a un campo magnetico oscillante ad una frequenza identica alla loro frequenza di precessione intorno a B_0 , essi assorbono energia e in questo modo si produce un'eccitazione sul sistema protonico, i nuclei risentono di questa transizione energetica e perdono il loro stato di equilibrio.

Ciò che succede è che B_1 , causa l'inclinazione di M_z (magnetizzazione netta), dalla posizione di riposo, parallela a B_0 , verso il piano xy di un certo angolo α , detto *flip angle*; il moto di M_z è costretto a seguire una traiettoria a spirale intorno a B_0 . L'ampiezza del *flip angle* dipende dall'ampiezza di B_1 e dalla durata della sua applicazione (**Figura 9**).

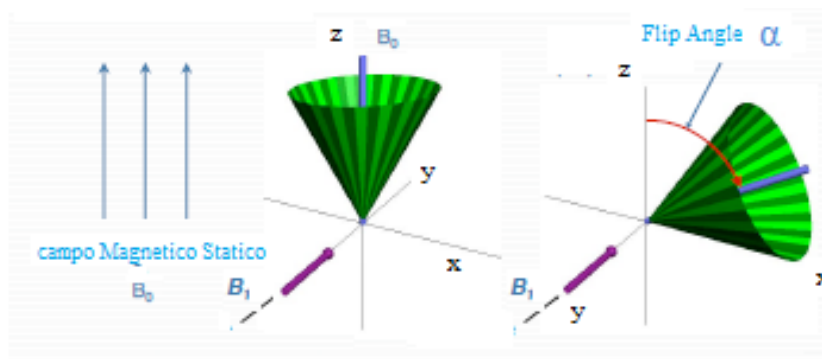


Figura 9 Fenomeno della risonanza: quando un campo magnetico a RF alla frequenza di Larmor si aggiunge al campo statico la condizione di equilibrio viene perturbata e i protoni cominciano a ruotare intorno ad esso.

Al cessare dell'impulso di eccitazione a RF il sistema protonico si trova in una situazione di non equilibrio dovuta alla quantità di energia assorbita che genera instabilità e tendenza al ripristino delle condizioni iniziali. All'eccitazione protonica segue quindi una fase durante la quale gli spin tenderanno a liberarsi dell'energia in eccesso fino a tornare nella condizione iniziale che è più stabile e più probabile. La magnetizzazione M , quindi, ritorna nel suo stato di equilibrio attraverso un processo di decadimento caratterizzato da un andamento esponenziale, ciò avviene attraverso due fenomeni di rilassamento: spin-spin e spin-reticolo.

I fenomeni di rilassamento comportano la liberazione dell'energia immagazzinata durante l'applicazione di B_1 , ciò produce il segnale di RM che si misura, infatti, la magnetizzazione trasversale, mentre torna all'equilibrio, induce un segnale nella bobina di ricezione, il segnale presente ai capi della bobina durante il rilassamento viene detto Free Induction Decay (FID) ed è quello che genererà l'immagine.

1. Rilassamento spin-reticolo o longitudinale: è un fenomeno per mezzo del quale la magnetizzazione netta recupera il suo allineamento con la direzione del campo statico B_0 . I nuclei ritornano al loro stato di equilibrio, restituendo al reticolo (ambiente circostante) l'energia acquisita dalla popolazione di spin durante gli impulsi di eccitazione a radiofrequenza. Tale fenomeno di rilassamento avviene secondo processi di recupero esponenziali caratterizzati da una costante di tempo T_1 che determina la velocità con cui la componente longitudinale del vettore magnetizzazione, M_z , ritorna nella condizione di equilibrio M_0 ; l'equazione che descrive questo fenomeno in funzione del tempo è:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (1)$$

2. Rilassamento spin-spin o trasversale: consiste nella progressiva perdita di coerenza del sistema di spin, poiché ciascuno precessa a frequenza leggermente diversa da $\Omega_0 = \gamma B_0$ a causa della presenza di variazioni locali del campo magnetico statico. Ciascun protone è infatti immerso in un campo magnetico risultante che non è B_0 , perché ciascuno risente del piccolo campo magnetico generato da tutte le cariche in movimento che gli stanno vicine. L'interazione tra gli spin causa la precessione dei momenti magnetici nucleari a velocità diverse (non più tutte in fase con velocità ω_0). La perdita di coerenza di fase, dovuta appunto alle interazioni spin-spin provoca un decadimento esponenziale della magnetizzazione trasversale con costante di tempo T_2 . Questo è il processo attraverso il quale la componente M_{xy} decade esponenzialmente verso il suo valore nullo di equilibrio; l'equazione che descrive questo fenomeno in funzione del tempo è:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-t/T_2} \quad (2)$$

Inoltre, se le particelle paramagnetiche producono una variazione spaziale (disomogeneità) del campo magnetico statico B_0 nell'oggetto si verifica un'ulteriore dispersione di fase (oltre a quella dovuta all'interazione spin-spin) che produce un ancor più rapido decadimento trasversale del segnale. In un sistema ideale, tutti i nuclei all'interno di un campo magnetico precessano con la stessa frequenza. D'altro canto, nei sistemi reali, piccole differenze nell'ambiente chimico soggetto a campo magnetico

possono causare una dispersione di frequenze attorno a quella ideale di risonanza Ω_0 e quindi indurre una disomogeneità all'interno di B_0 . Questa disomogeneità (indicata con ΔB_0) causa inevitabilmente un ulteriore defasamento relativo dei nuclei di idrogeno tra loro, e ha come effetto quello di produrre un ulteriore contributo al processo di rilassamento trasversale al punto che diventa necessario definire un'altra costante di tempo T_2^* , che esprime la velocità di decadimento trasversale complessiva ed è pari alla somma di due contributi distinti:

1. Il contributo del rilassamento spin-spin ($1/T_2$);
2. Il contributo del rilassamento dato dalla disomogeneità del campo B_0 ($1/T_2'$).

T_2^* è il tempo di rilassamento spin-spin comprensivo sia dei contributi dovuti alle interazioni molecolari sia alle disomogeneità di campo magnetico. A causa di ciò la perdita di coerenza degli spin nel piano trasversale è più rapida.

Il contrasto nelle immagini RM è ottenuto grazie alle diverse proprietà magnetiche dei tessuti. I parametri comunemente usati sono: densità protonica ρ , T_1 , T_2 e T_2^* ; questi parametri assumono valori molto diversi, sia che si faccia riferimento a tessuti diversi sia che ci si riferisca allo stesso tessuto in condizioni diverse (stato normale o patologico).

Impostando quindi in maniera opportuna i parametri di misura del segnale di RM, ovvero: tempo di ripetizione TR (tempo che intercorre tra un impulso RF e il successivo), tempo di eco TE (tempo che intercorre tra l'impulso di eccitazione RF e l'istante in cui il segnale eco acquisito ha ampiezza massima) e flip angle α , si possono generare diversi tipi di sequenze ed ottenere diverse tipologie di immagine:

1. Immagini T1-pesate: sono ottenute impostando brevi TR (<750 ms) e brevi TE (<40 ms). Grazie al TR molto breve, è possibile ottenere acquisizioni molto veloci che permettono di avere immagini ad elevata risoluzione (**Figura 10b**);
2. Immagini T2-pesate: sono ottenute impostando lunghi TR (>1500 ms) e lunghi TE (>75 ms) (**Figura 10a**);
3. Immagini ρ -pesate: sono ottenute impostando lunghi TR (>1500 ms) e brevi TE (<40 ms) (**Figura 10c**).

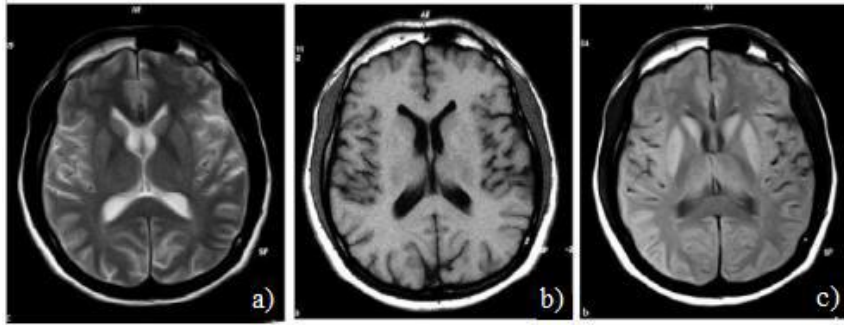


Figura 10 Immagini cerebrali a) T2 pesata b) T1 pesata e c) ρ pesata [13].

Quello che si misura nell'MRI è il segnale Free Induction Decay, o FID; tale segnale può essere rilevato utilizzando una bobina ad induzione elettromagnetica (la stessa usata per applicare B_1) come antenna per captare le variazioni temporali di M_z una volta che l'impulso a RF è stato applicato.

Infatti, durante il riallineamento di M_z nella direzione di B_0 , M_{xy} tende a 0 e si osserva una variazione del flusso concatenato alla bobina rilevabile sotto forma di tensione elettrica ai capi della stessa; dalla forma e dall'ampiezza di tale tensione è possibile misurare T1 e T2, consentendo quindi di ottenere informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche del tessuto di cui gli spin esaminati appartengono. La misura del FID, quindi, dipende dai tre parametri T1, T2, ρ , e in base al tipo di sequenza utilizzata si può enfatizzare l'uno o l'altro parametro.

3.1.1 Formazione dell'immagine

Alla base di qualunque tecnica di imaging sta la possibilità di distinguere il segnale che proviene dai diversi voxel. Nella tecnica di RM il segnale è sotto forma di onde elettromagnetiche di frequenza 63 MHz (magnete da 1.5 T) o 126 MHz (magnete 3T). A questa frequenza non è possibile distinguere il segnale che proviene da voxel vicini solo qualche millimetro o frazioni di millimetro. Perciò la radiofrequenza viene ricevuta (e trasmessa) sempre da tutto il volume interno al magnete. Ciò che differenzia i vari voxel (e quindi permette la formazione dell'immagine) è il diverso campo magnetico in cui sono immersi che determina differenti frequenze di risonanza.

I campi gradienti permettono di variare il campo magnetico lungo i tre assi spaziali in modo controllato e sono quindi indispensabili per ottenere delle immagini. Nelle sequenze per imaging, quindi, oltre agli impulsi RF (90° e 180°) si applicano anche i gradienti; i gradienti permettono da un

lato, l'eccitazione selettiva di una sezione (slice) da esaminare, e dall'altro la localizzazione spaziale dell'impulso di ritorno, per dedurre dal segnale la zona della slice in cui questo è stato prodotto.

La discriminazione spaziale è effettuata attivando opportunamente i tre gradienti (lungo x, y, z), così da ottenere tre tipi di codifica, lungo le tre direzioni spaziali: eccitazione selettiva, codifica di frequenza e codifica di fase.

La tecnica di eccitazione selettiva è il metodo grazie al quale l'eccitazione di RM, e dunque il segnale ricevuto, è limitata ad una fetta scelta in un campione o in un paziente; per questo tale codifica è anche detta selezione della fetta. Una bobina, detta bobina di selezione, aggiunge al campo magnetico statico B_0 un ulteriore campo, la cui intensità varia linearmente in rapporto alla distanza dalla bobina che lo emette. Insieme all'impulso a 90° viene applicato, il gradiente detto "Slice Selection Gradient" lungo l'asse z, cioè in direzione perpendicolare alla fetta desiderata.

Siccome le frequenze di precessione dipendono dal campo magnetico, anche esse varieranno con la distanza dalla bobina. L'effetto dell'attivazione contemporanea del gradiente e dell'impulso RF ad una determinata frequenza è dunque quello di eccitare solo i protoni che compiono moto di precessione a quella frequenza e si trovano ad una certa distanza dalla bobina; quindi, vengono eccitati tutti i protoni all'interno della fetta selezionata.

In questo modo avviene la selezione di una slice corrispondente ad una data distanza dalla bobina. Variando la frequenza dell'impulso RF si può via via coprire tutto il range delle frequenze di precessione e così si ottiene un'immagine di tutto il volume desiderato.

È possibile anche modificare lo spessore delle slices, variando il campo emesso dalla bobina di selezione.

Dunque, la sequenza di attivazione e disattivazione dei gradienti che permette la formazione dell'immagine RM, consiste in:

1. Selezione di una fetta di eccitazione selettiva degli spin (**Figura 11a**), il gradiente di selezione della fetta fa sì che solo i protoni che giacciono su una fetta e che precedono ad una specifica frequenza, risentano dell'impulso RF a frequenza Ω_0 ;
2. Attivazione di un gradiente di codifica di fase tra l'impulso di eccitazione RF e il periodo di lettura (**Figura 11b**); immediatamente dopo la disattivazione dell'impulso RF e del gradiente di selezione fetta viene attivato, per un brevissimo tempo, il gradiente di fase, in modo tale che le frequenze di precessione dei protoni lungo la direzione del gradiente siano diverse tra loro. Il gradiente di fase viene poi disattivato, perciò tutti i protoni ritornano a precedere alla frequenza iniziale, ma restano tra loro sfasati lungo la direzione del gradiente di fase;

- Attivazione di un gradiente di lettura (o di codifica di frequenza) durante il quale è raccolto il segnale di RM (**Figura 11c**). Ciascun segnale è acquisito durante l'attivazione del gradiente di lettura, cosicché si crea una distribuzione di diverse frequenze lungo la direzione del gradiente stesso.

La sequenza appena descritta è illustrata in **Figura 11**.

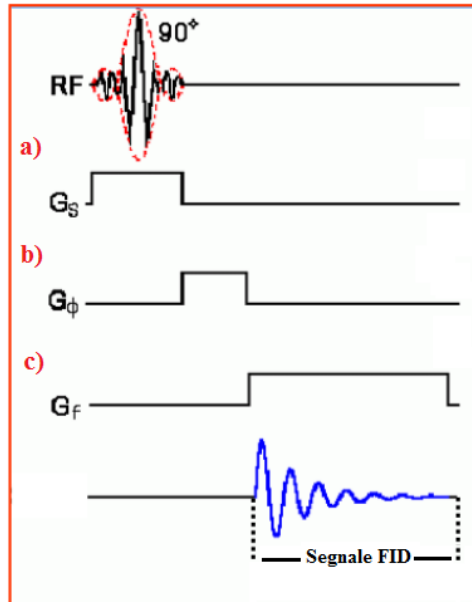


Figura 11 (a) Selezione di una fetta ad eccitazione selettiva; (b) Attivazione del gradiente di codifica di fase tra l'impulso di eccitazione e il periodo di lettura; (c) Attivazione del gradiente di lettura durante il quale è raccolto il segnale FID.

Al fine di ottenere l'immagine, questa sequenza è ripetuta più volte, variando ogni volta l'ampiezza del gradiente di fase.

Per separare i segnali provenienti dai diversi voxel, si utilizza l'analisi di Fourier, così da ogni singola onda vengono estratte le varie frequenze, corrispondenti alle varie posizioni. Lo spazio che si ottiene è detto k-spazio, e contiene una rappresentazione bidimensionale di tutte le posizioni della slice così ricostruita. Il tempo trascorso tra l'erogazione dell'impulso e il picco di segnale eco è detto tempo di eco (Echo Time, TE), ed è un parametro importante per le analisi in fMRI.

I segnali eco sono acquisiti sotto gradiente, ogni volta che si ripete la sequenza (dopo un opportuno tempo TR), si acquisisce un nuovo eco avendo però applicato un gradiente di codifica di fase diverso, alla fine del procedimento risulta riempito tutto il k-spazio, e una volta ottenuto il k-spazio, si esegue una trasformata di Fourier bidimensionale e si ottiene l'immagine (**Figura 12**).

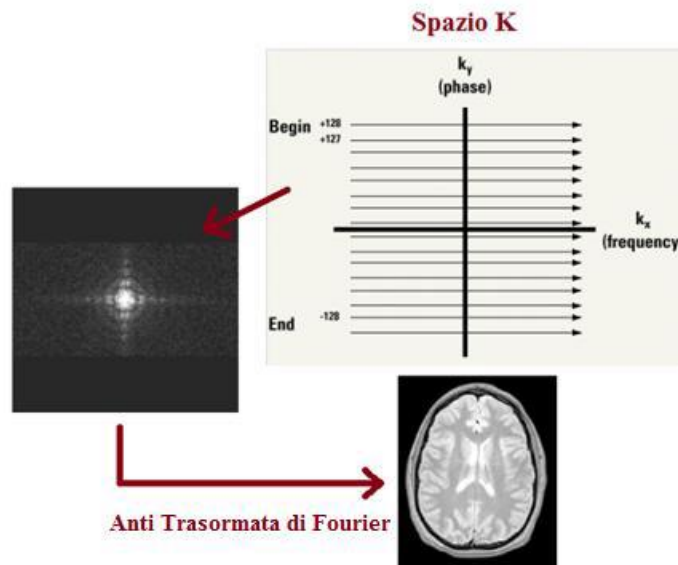


Figura 12

Quando tutto il volume è stato acquisito il processo di eccitazione e scansione riprende da capo. L'intervallo tra due scansioni successive della stessa regione, cioè il tempo che trascorre prima che un'area venga acquisita successivamente, è detto risoluzione temporale. In buona parte degli studi questo tempo ammonta a circa 1,5-2 secondi.

3.1.2 Acquisizione dell'immagine

Le immagini funzionali vengono acquisite mediante la sequenza *Echo Planar Imaging* (EPI).

EPI è una tecnica di imaging di risonanza magnetica “ultra veloce” in grado di produrre immagini tomografiche a frequenza video (da 15 a 30 immagini al secondo). La sequenza di scansione più comunemente usata negli studi di fMRI dell'encefalo è detta GE-EPI (*Gradient-Echo Echo Planar Imaging*). La sequenza EPI è un procedimento di acquisizione delle immagini molto veloce che richiede macchine sofisticate e che è in grado di applicare i tre gradienti di impulso descritti precedentemente in successione molto rapida; tutto ciò consente una scansione molto veloce con un TE molto basso: l'intero volume, infatti, è acquisito in circa 50-100 ms. Lo svantaggio di una così elevata rapidità di scansione è la presenza di artefatti, legati al movimento, o ad altro, che necessitano di essere aboliti durante la postproduzione delle immagini.

La tecnica EPI prevede un'oscillazione nell'applicazione dei gradienti di codifica, in maniera tale da campionare il k-spazio seguendo una traiettoria a “zig-zag”. Questo stratagemma evita il

riposizionamento all'inizio di ogni riga durante il campionamento. L'intero k-spazio viene, pertanto, riempito in un tempo pari a TR, portando ad un'ulteriore riduzione nei tempi totali di acquisizione.

3.2 Risonanza Magnetica Funzionale: fMRI

La Risonanza Magnetica funzionale è una metodica di recente introduzione nel campo dell'imaging, la sua comparsa risale ai primi anni Novanta quando K. Thulborn e S. Ogawa, sfruttando l'effetto BOLD descritto molti anni prima da L. Pauling, ottennero immagini MR contenenti informazioni sull'attività cerebrale [14].

La Risonanza Magnetica funzionale, oggi, è uno strumento d'indagine estremamente importante in campo neurologico: è una tecnica completamente non invasiva che permette di localizzare l'attività cerebrale con una buona accuratezza temporale e, soprattutto, con una risoluzione spaziale millimetrica. Sebbene la fMRI non possa competere con le tecniche magneto/elettro-fisiologiche (EEG e MEG) in termini di risoluzione spaziale, supera di gran lunga le tecniche di medicina nucleare (SPECT e PET), rispetto alle quali permette di acquisire, nella stessa sessione d'esame, immagini sia anatomiche che funzionali senza fare uso di radiazioni ionizzanti.

Questo metodo di indagine si basa su variazioni del segnale di RM in seguito alla risposta emodinamica e metabolica in una regione in cui si ha un'attivazione neuronale indotta da stimoli interni o esterni. L'fMRI non è una misura diretta; ciò che viene misurato è infatti, la variazione dell'ossigenazione sanguigna nel tempo legata all'attività neuronale che viene generata in uno specifico contesto sperimentale, cioè il segnale BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent), per ottenere il segnale BOLD, l'fMRI sfrutta i cambiamenti di magnetizzazione che si registrano tra il flusso ematico povero di ossigeno e il flusso ematico ricco di ossigeno.

Sebbene sia anche utilizzata in ambito clinico, l'fMRI è una tecnica principalmente usata nel modo della ricerca, lo scopo principale degli esperimenti di fMRI è quello di individuare, sia in soggetti sani che in soggetti patologici, le aree del cervello attivate sia durante task di stimolazione predefiniti che in assenza di essi, in maniera facilmente interpretabile e riproducibile, attraverso la generazione di mappe di attivazione che mostrino le aree cerebrali attive nel task scelto.

3.3 Il segnale BOLD

L'attività cerebrale e i suoi cambiamenti sono associabili a cambiamenti delle richieste energetiche: tanto maggiore è l'attività funzionale dell'area cerebrale, tanto maggiore sarà il suo metabolismo e, di conseguenza, la sua richiesta energetica in termini di ossigeno, per soddisfare l'aumentato bisogno di ossigeno, il flusso sanguigno aumenta.

L'ossigeno viene trasportato nel sangue legato all'emoglobina, una proteina globulare contenente un atomo di ferro che si ossida (ossiemoglobina) quando un atomo di ossigeno gli si lega, mentre si riduce (deossiemoglobina) quando perde ossigeno.

L'aspetto interessante per gli studi di fMRI risiede nella diversa natura magnetica dell'ossiemoglobina e della deossiemoglobina e nella variazione del rapporto deossiemoglobina/ossiemoglobina all'interno del flusso sanguigno cerebrale.

L'emoglobina ossigenata presenta caratteristiche diamagnetiche, cioè non possiede elettroni spaiati e ha momento magnetico nullo, mentre l'emoglobina deossigenata è paramagnetica, cioè possiede elettroni spaiati e dunque ha un momento magnetico diverso da zero.

Il sangue completamente deossigenato è caratterizzato da una suscettività magnetica² maggiore del 20% rispetto a quella del sangue completamente ossigenato. L'introduzione di un materiale con suscettività magnetica all'interno di un campo magnetico causa lo sfasamento degli spin nucleari determinando un decadimento della magnetizzazione trasversale; la deossigenazione del sangue, modificando la suscettività magnetica, fa variare il segnale di risonanza magnetica che aumenta al diminuire della deossigenazione, e infatti, la diminuzione della concentrazione di deossiemoglobina nelle regioni in cui vi è attività neuronale causa un aumento dell'intensità dell'immagine.

Tramite esperimenti su animali si dimostra che, con campi magnetici B_0 maggiori di 1.5 T e immagini T2-pesate, è possibile misurare un segnale dipendente dal livello di emoglobina deossigenata presente nelle diverse regioni cerebrali, tale segnale prende il nome di segnale BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) [15].

La variazione di segnale di RM causata da modifiche dell'attività neurale viene definita come risposta emodinamica (o HDR), la risposta emodinamica non ha una forma costante, ma varia in funzione dello stimolo dal quale viene generata. Solitamente, un aumento della frequenza di stimolazione e quindi, dell'attività nervosa, fa aumentare l'ampiezza dell'HDR, mentre se i neuroni sono attivati in maniera continua, per esempio in seguito ad uno stimolo prolungato nel tempo, al picco del segnale fa seguito un plateau.

² costante di proporzionalità adimensionale che quantifica il grado di magnetizzazione del materiale in seguito all'applicazione di un campo magnetico

In **Figura 13** è rappresentato l'andamento del segnale BOLD in risposta ad uno stimolo: la prima deflessione negativa del segnale, cioè l'initial dip, è dovuto al fatto che l'aumento del flusso sanguigno in seguito all'attività neuronale causa un flusso entrante di sangue nel sistema venoso maggiore di quello uscente, nelle piccole vene tale aumento è caratterizzato dalla presenza di emoglobina deossigenata e provoca una perdita del segnale di RM. Il successivo aumento del segnale è dovuto ad un aumento sproporzionato del flusso sanguigno rispetto all'aumento del volume ematico, questo fa sì che la deossiemoglobina diminuisca facendo aumentare il segnale. Dopo il picco del segnale, il metabolismo dei neuroni attivi causa un continuo consumo di ossigeno che provoca un aumento di concentrazione di deossiemoglobina che porta ad una riduzione del segnale fino a raggiungere un minimo, al di sotto della baseline detto undershoot, infine, dopo aver raggiunto il minimo, il segnale riprende ad aumentare e ritorna alle sue condizioni iniziali.

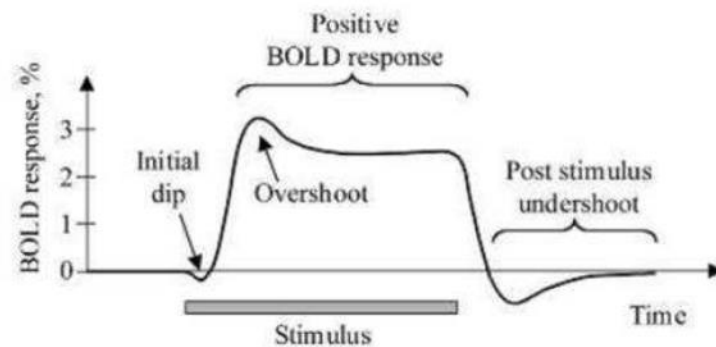


Figura 13 Andamento del segnale BOLD in seguito ad uno stimolo.

È bene sottolineare che il segnale BOLD relativo ad un voxel, rappresenta la quantità totale di emoglobina deossigenata presente, ma può essere influenzato da una molteplicità di fattori, tra cui malattie, ansia, farmaci vasodilatatori, sedativi.

3.4 Risonanza Magnetica Funzionale in resting state

La variazione del segnale BOLD in relazione allo svolgimento di un determinato compito o in risposta ad uno stimolo consente di collegare la topologia del cervello alla funzione stimolata, nel segnale BOLD, inoltre, è presente una modulazione spontanea che non è attribuibile a nessun input funzionale, negli studi di fMRI in cui il soggetto è sottoposto a dei task specifici, tale attività viene considerata rumore.

Quello che ha determinato la nascita di un certo interesse nell'approfondire studi su questo "rumore" sono stati principalmente due considerazioni, una di carattere energetico e l'altra di carattere sperimentale. La prima considera il fatto che il cervello rappresenta solo il 2% della massa totale del corpo, ma consuma il 20% dell'energia, gli aumenti del metabolismo neuronale in presenza di compiti funzionali sono solitamente inferiori al 5% del consumo energetico in assenza di essi, da ciò segue che le fluttuazioni spontanee del segnale BOLD sono dovute, in larga parte, alla spesa energetica del cervello [16].

La seconda considerazione, di carattere sperimentale, è la seguente: si è osservato che l'attività spontanea del sistema a riposo non è un rumore casuale ma è organizzata in maniera specifica [17]; con attività neuronale spontanea si intende un'attività non attribuibile ad uno specifico input o output, ma un'attività neuronale che viene intrinsecamente generata dal cervello. Per studiare tale attività tramite fMRI è necessario ridurre al minimo gli input sensoriali ed evitare lo svolgimento di qualsiasi task cognitivo: in un ambiente di studio tipico per l'fMRI resting-state, viene chiesto al soggetto di rimanere sdraiato con gli occhi chiusi e di non addormentarsi, infatti, la condizione di resting state è un particolare stato mentale che prevede il completo rilassamento dell'attività neuronale, durante la quale le connessioni cerebrali non sono impegnate in alcuna funzione.

L'fMRI resting state permette di registrare l'attivazione contemporanea di più regioni cerebrali, evidenziando in questo modo delle reti neurali, dette Resting State Networks, che si coattivano e interagiscono nello svolgere una determinata funzione. Nel cervello in condizioni di resting state sono state individuate diverse networks, le principali delle quali sono: la Default Mode Network (DMN), la Sensorimotor Network (SMN), la Visual (V-RSN) e l'Auditory Network (A-RSN), l'Executive Control Network (ECN), la Frontoparietal Network (FPN) e la Temporoparietal Network (TPN). Le RSNs sono sempre presenti nel cervello umano, sia nello stato di veglia, che durante il sonno o sotto anestesia, evidenziando il fatto che l'attività neuronale spontanea del cervello è sempre presente e svolge un ruolo fondamentale nelle funzioni cerebrali.

Una delle più interessanti applicazioni degli studi in resting state è proprio il confronto di RSNs tra gruppi. Dato che non ci sono task, gli studi possono essere condotti in soggetti incapaci di sottoporsi a particolari paradigmi sperimentali e non risentono del problema della sensibilità dei risultati all'impostazione dell'esperimento e alla sua esecuzione. Molti lavori in questo settore si sono focalizzati nel confrontare soggetti sani con soggetti affetti da malattie neurologiche o disordini psichici: alterazioni delle Resting State Networks sono state individuate in malattie come l'Alzheimer, la sclerosi multipla, la schizofrenia, l'autismo, l'epilessia e la sindrome da deficit di attenzione e iperattività [18, 19, 20]. E dunque, ciò suggerisce che lo studio della connettività

intrinseca mediante fMRI in resting state può fornire importanti informazioni diagnostiche in pazienti con malattie neurologiche e disordini psichici, e consente la valutazione dell'attività cerebrale durante il sonno, l'anestesia e gli stati vegetativi.

In **Figura 14** sono mostrate le sezioni sagittale, coronale e assiale delle principali Resting State Networks ottenute tramite un'analisi di rs-fMRI, in particolare sono evidenziate: la corteccia visiva primaria, la corteccia visiva extrastriata, la corteccia uditiva, la corteccia somatosensoriale, la Default Mode Network, la network implicata nel controllo esecutivo e le networks fronto-parietale destra e sinistra.

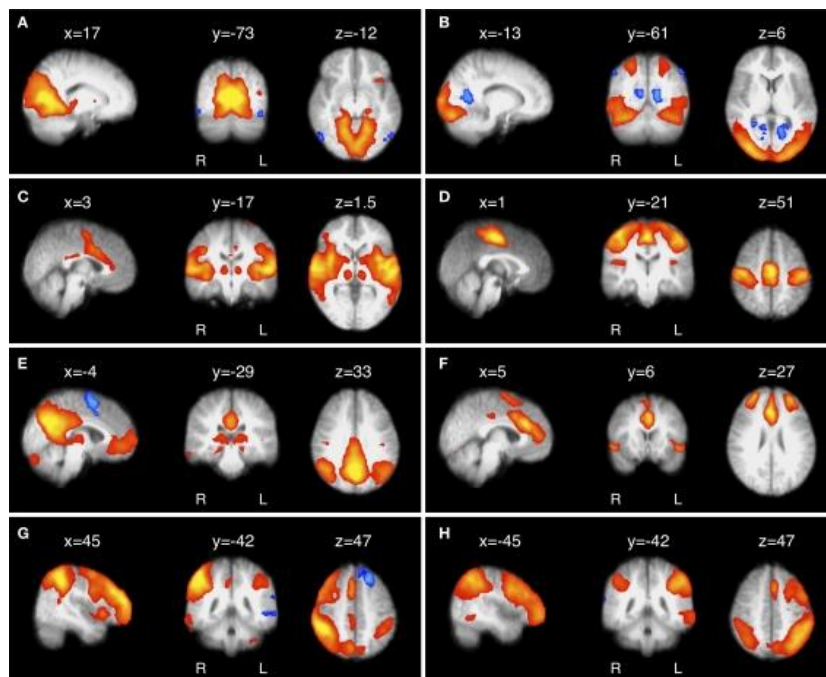


Figura 14 Otto delle più comuni RSNs individuate tramite un'analisi di ICA. Sono mostrate, da sinistra a destra, le sezioni sagittale, coronale e assiale delle differenti mappe spaziali ottenute da un'analisi di rs-fMRI su un gruppo di 10 soggetti. (A) corteccia visiva primaria; (B) corteccia visiva extrastriata; (C) corteccia uditiva; (D) corteccia somatosensoriale; (E) default mode network (DMN); (F) network implicata nel controllo esecutivo; (G-H) networks fronto-parietale destra e sinistra [21].

Capitolo 4: Tecniche di analisi dei dati

Vi sono due tipi di approcci alternativi volti all'analisi dei dati di fMRI, provenienti da due diverse linee di pensiero: approcci di natura confermativa o model-based, ed approcci di natura esplorativa o model-free. Mentre i primi sono naturalmente portati a fare delle assunzioni circa i segnali d'interesse e a mettere a punto un modello che li rappresenti adeguatamente per poterli fittare nel miglior modo possibile, gli approcci del secondo tipo prescindono dalla creazione di un modello.

La prima linea di pensiero, model-based, ha portato allo sviluppo delle cosiddette tecniche CDA, Confirmatory Data Analysis, tra le quali riveste particolare importanza il General Linear Model (GLM), mentre il secondo approccio, model-free, ha aperto la strada alle tecniche EDA, Exploratory Data Analysis.

Mentre per le classiche tecniche model-based la sequenza tipica del modo di procedere è:



Figura 15

Per le tecniche EDA la sequenza è:

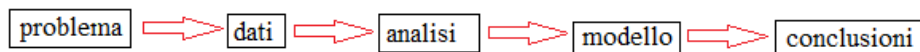


Figura 16

E può portare a risultati inaspettati.

A differenza quindi dell'approccio di tipo confermativo, focalizzato su modello e stima parametrica, l'analisi esplorativa dei dati è concentrata sui dati, sulla loro struttura e sui modelli che i dati possono suggerire.

4.1 General Linear Model

Le tecniche CDA attualmente applicate ai dati fMRI testano ipotesi specifiche riguardanti la risposta attesa del segnale BOLD su specifici voxel. La loro peculiarità consiste nel fare assunzioni a priori a riguardo delle caratteristiche spazio-temporali dei segnali contenuti all'interno dei dati. Il problema principale è la possibile presenza all'interno dei dati di artefatti erroneamente modellati; ad esempio, la presenza di rumore temporale non ortogonale al modello ipotizzato influenza negativamente la

stima dei parametri, riducendo così la qualità dell'analisi. In generale, qualsiasi discrepanza tra il segnale ipotizzato e il segnale reale conduce ad un'analisi sub-ottima [22].

Appartenente alla categoria CDA, il General Linear Model (GLM) rappresenta un modello di regressione lineare avente lo scopo di descrivere la relazione esistente tra un particolare stimolo e i dati osservati [23]. Esso esprime i dati fMRI come combinazione lineare pesata di variabili indipendenti più un termine dovuto al rumore. Se in diciamo con Y la matrice dei dati osservati di dimensioni $[K \times N]$, in cui un singolo valore $Y_{k,n}$ rappresenta il valore dell' n -esimo voxel osservato nel k -esimo istante temporale, otteniamo la seguente rappresentazione matriciale:

$$Y_{[K \times N]} = X_{[K \times P]} \times \beta_{[P \times N]} + \varepsilon_{[K \times N]} \quad (3)$$

Dove: N è il numero di voxel acquisiti, K il numero di scansioni, β il vettore dei parametri da stimare ed ε il termine d'errore, la matrice $X_{[K \times P]}$ prende il nome di *design matrix*, la matrice $\beta_{[P \times N]}$ è la matrice dei parametri, infine, $\varepsilon_{[K \times N]}$ rappresenta il rumore. Graficamente è possibile rappresentare il modello GLM come mostrato in **Figura 17**.

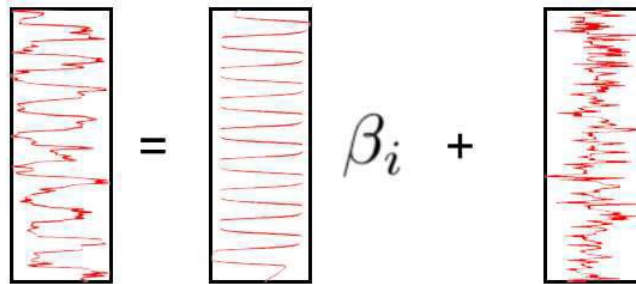


Figura 17 Rappresentazione grafica del GLM.

Tuttavia, se la matrice X , opportunamente creata in base alle ipotesi messe a punto, non è in grado di catturare tutte le sorgenti coinvolte nella formazione del dato osservato complessivo Y , si ottengono conclusioni scorrette.

4.2 Analisi delle Componenti Indipendenti

L'Analisi delle Componenti Indipendenti (ICA) è una tecnica di analisi statistica che partendo dal segnale registrato, permette di estrarre le sorgenti originali, spaziali e temporali (*time-course*), sfruttando la condizione di indipendenza statistica di queste ultime [22, 24]. Questo problema prende il nome di *Blind Source Separation* (BSS), dove il termine inglese blind indica che le sorgenti sono quasi del tutto ignote. Il risultato sarà un insieme di componenti indipendenti (Independent Components, ICs) alcune delle quali chiaramente relative all'attivazione neuronale, mentre altre collegate ai processi fisiologici o ad artefatti. L'ICA costituisce un metodo computazionale per separare un segnale multivariato, tramite decomposizione lineare, nelle sue componenti additive, ipotizzando la loro mutua indipendenza statistica e non gaussianità; questo perché sia i segnali sorgenti, che il processo di mescolamento, sono del tutto sconosciuti, ed è proprio l'indipendenza statistica a guidare i metodi di stima delle sorgenti di interesse.

Si può descrivere l'analisi ICA ricorrendo all'esempio del cocktail party: supponiamo di voler registrare la conversazione di un certo numero di persone tramite dei microfoni, il segnale misurato da ciascun microfono riflette l'insieme dei segnali provenienti dai vari interlocutori. L'obiettivo è quello di distinguere il contributo al segnale dei diversi interlocutori a partire dal segnale registrato dal microfono considerato. Si assume che i microfoni e i soggetti non si muovono durante la registrazione così che il processo possa essere considerato stazionario. Per poter risolvere il problema della separazione delle sorgenti con l'analisi ICA, vengono fatte le seguenti assunzioni:

- Le sorgenti sono assunte statisticamente indipendenti; due variabili casuali s_1 e s_2 sono statisticamente indipendenti quando la loro probabilità congiunta è uguale al prodotto delle singole probabilità: $P(s_1, s_2) = P(s_1)P(s_2)$;
- Le sorgenti non possono avere una distribuzione gaussiana.

Consideriamo di avere N segnali (componenti) statisticamente indipendenti, $\mathbf{s} = [s_1, s_2, \dots, s_N]^T$ e di registrarli attraverso M rilevatori ottenendo così un vettore $\mathbf{x} = [x_1, x_2, \dots, x_M]^T$, con $M \geq N$, di segnali registrati [25]. I sensori devono essere spazialmente separati in modo che ognuno di essi registri una diversa combinazione dei segnali provenienti dalle sorgenti, con questa assunzione il modello ICA in forma matriciale è espresso dalla seguente equazione.

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s} \tag{4}$$

dove $\mathbf{A}_{[M \times N]}$, detta matrice di mixing, rappresenta il peso di ciascuna componente del segnale finale. L'obiettivo è quello di ricostruire i segnali originali \mathbf{s} a partire dal set di segnali registrati \mathbf{x} , per

ottenere una stima di ciò si ricava prima la matrice di unmixing $\mathbf{W}_{[N \times M]}$ la quale permette di ottenere una stima delle sorgenti indipendenti secondo questa equazione:

$$\hat{\mathbf{s}} = \mathbf{W}\mathbf{x} \quad (5)$$

Questa assunzione è valida se la matrice di mixing è invertibile.

Poiché si dà per assunto che le sorgenti sono statisticamente indipendenti, conoscere il valore di una non dà informazioni sul valore dell'altra. Quando le componenti sono generate da processi indipendenti, come nel caso dei processi neurali nell'fMRI, la tecnica ICA permette di identificare correttamente le sorgenti del segnale purché sia valida l'ipotesi di non gaussianità.

Uno degli algoritmi utilizzati per la determinazione delle ICs è l'algoritmo FastICA che massimizza la non gaussianità sfruttando l'*entropia differenziale* [26]. L'entropia differenziale rappresenta la variazione di entropia che deve essere nulla nel caso in cui venga applicata ad una variabile con distribuzione gaussiana, e non negativa in caso contrario. In generale, l'entropia di una variabile casuale può essere interpretata come la quantità di informazione necessaria per descrivere la variabile stessa: maggiore è la casualità, minore è l'informazione che possediamo sulla variabile, e maggiore è l'entropia. Per una variabile aleatoria continua y , con una funzione di densità di probabilità $P(y)$, si definisce l'entropia come:

$$H(y) = - \int_{-\infty}^{+\infty} P(y) \ln P(y) dy \quad (6)$$

Una variabile gaussiana ha entropia maggiore tra tutte le variabili casuali di uguale varianza; quindi, l'entropia può essere usata come misura di non gaussianità. Si definisce *entropia differenziale* J di una variabile aleatoria y come:

$$J(y) = H(y_{gauss}) - H(y) \quad (7)$$

Dove, y_{gauss} è una variabile aleatoria gaussiana con la stessa varianza di y . Poiché l'entropia della variabile y_{gauss} è massima, l'entropia differenziale di y , $J(y)$, è sempre positiva o uguale a 0 quando y è proprio una variabile a distribuzione gaussiana; quindi, per massimizzare la non gaussianità si massimizza l'entropia differenziale.

Nell'analisi ICA in fMRI si assume che i dati possano essere modellati identificando set di voxel la cui attività varia nel tempo in modo simile e distinguibilmente differente da quella degli altri set. L'ICA quindi, determina delle componenti spazialmente indipendenti, ciascuna caratterizzata da un andamento temporale caratteristico, cioè i dati provenienti da n voxel misurati in t distinti istanti temporali sono rappresentati da una matrice \mathbf{X} tale che:

$$\mathbf{X}_{[t \times n]} = \mathbf{A}_{[t \times t]} \mathbf{S}_{[t \times n]} \quad (8)$$

La matrice \mathbf{S} conterrà sulle sue righe mappe spaziali statisticamente indipendenti, ovvero aree spaziali del cervello, ognuna caratterizzata dalla particolare serie temporale contenuta nella colonna associata della matrice quadrata di mixing \mathbf{A} .

I dati complessivi sono quindi decomposti in un insieme di mappe spaziali indipendenti e in un insieme di serie temporali associate. Le sorgenti sono stimate ottimizzando iterativamente una matrice di unmixing \mathbf{W} tale che:

$$\mathbf{W} = \mathbf{A}^{-1} \quad (9)$$

Dove la matrice di mixing \mathbf{A} è supposta quadrata, in questo modo, la matrice delle sorgenti scritta nella forma:

$$\mathbf{S} = \mathbf{W}\mathbf{X} \quad (10)$$

contiene righe mutuamente indipendenti.

Nella tecnica ICA non è incluso un modello di rumore, questo implica che le minime differenze nella funzione di risposta emodinamica (HDR) misurate in diversi voxel sono necessariamente trattate come "effetti reali". Tali differenze potrebbero rappresentare sia valide variazioni spaziali (ad esempio risposte temporali leggermente diverse tra emisfero destro e sinistro) che variazioni del livello di rumore di fondo; questo può causare che clusters di voxel che si attivano per uno stesso stimolo esterno vengano frammentati in diverse mappe spaziali. Inoltre, questo modello non permette l'applicazione di test di significatività statistica.

Al fine di affrontare queste problematiche è stato sviluppato il modello ICA probabilistico per dati fMRI, il quale consente un processo di mixing non quadrato e assume che i dati siano corrotti da rumore additivo gaussiano [27].

4.2.1 Probabilistic Independent Component Analysis

Il modello Probabilistic Independent Component Analysis (PICA) è stato formulato per risolvere i due problemi principali della metodologia ICA classica applicata a dati di fMRI, uno dei quali è il fatto che trascurare il rumore può causare una stima imprecisa della dimensione vera delle sorgenti indipendenti portando al fenomeno dell'overfitting. Infatti, dover fittare con un modello noise-free acquisizioni rumorose, può portare alla generazione di troppe componenti in uscita, ciò porta alla frammentazione del segnale in mappe spaziali multiple riducendo la possibilità di identificare il segnale d'interesse [28]. Un altro problema è quello di non poter associare significatività statistica ai singoli voxels all'interno delle mappe spaziali.

Tutte queste difficoltà vengono superate con il modello Probabilistic Independent Component Analysis che introduce nel modello ICA classico una matrice di mixing non quadrata e un termine di rumore additivo e gaussiano, espresso nella seguente equazione:

$$X_{[t \times n]} = A_{[t \times q]} \times S_{[q \times n]} + \eta_{[t \times n]} \quad (11)$$

Dove t rappresenta i time points, n il numero di voxel, e q il numero di componenti statisticamente indipendenti [27], il rumore fisiologico appare nei dati come rumore gaussiano. Riscrivendo la precedente equazione per un singolo voxel i si ha:

$$x_i = A s_i + \mu + \eta_i \quad (12)$$

Dove x_i denota il vettore colonna t -dimensionale di singole misurazioni di voxel alla posizione i , s_i è il vettore colonna q -dimensionale di sorgenti non gaussiane, ed infine η_i rappresenta il rumore gaussiano. Si assume che $q < t$, ovvero che ci sono meno processi sorgente rispetto alle osservazioni temporali. Il vettore μ definisce la media delle osservazioni x_i e la matrice di mixing A , di dimensione $[t \times q]$, che mette in relazione il vettore \mathbf{t} delle osservazioni con il corrispondente vettore \mathbf{q} delle variabili latenti (s) è ipotizzata di rango q .

Per risolvere il problema di separazione delle sorgenti occorre trovare una matrice \mathbf{W} , di dimensioni $[q \times t]$, tale che la stima:

$$\hat{\mathbf{s}} = \mathbf{W}\mathbf{x} \quad (13)$$

sia una buona approssimazione delle sorgenti \mathbf{s} .

Prima di procedere alla stima delle sorgenti tramite Fast-ICA, si devono eseguire delle operazioni preliminari sui dati:

- *Centering*: i dati vengono resi a media nulla;
- *Pre-Whitening* spaziale dei dati: dopo aver reso i dati osservati \mathbf{x} a media nulla, si trasforma (mediante decomposizione a valori singolari SVD della matrice di covarianza) l'insieme di variabili casuali aventi Σ come matrice di covarianza, in una serie di nuove variabili casuali la cui matrice di covarianza è la matrice identità \mathbf{I} , in modo da ottenere segnali scorrelati e con varianza unitaria ($\sigma^2 = 1$);
- *Pre-Whitening* della covarianza del rumore: consiste nell'operare il *whitening* dei dati relativamente alla covarianza del rumore, rendendolo in questo modo isotropo in ogni voxel ($\sigma^2\mathbf{I}$);
- Come ultimo step del pre-processing viene eseguita un'analisi Probabilistic Principal Component Analysis (PPCA) che consente di ridurre la dimensionalità dei dati.

4.3 Software moderni per l'analisi dei dati fMRI

Per l'analisi delle immagini di risonanza magnetica funzionale in resting state si possono utilizzare diversi software, in seguito se ne citano alcuni.

- FSL (*FMRIB Software Library*): creata dal Gruppo Analisi FMRIB, Oxford, Regno Unito, FSL è una libreria completa di strumenti di analisi per dati di imaging cerebrale fMRI, MRI e DTI, funziona su Apple e Linux (su Windows è necessaria una macchina virtuale). La maggior parte degli strumenti può essere eseguita sia dalla linea di comando, che, nel caso di Linux, dalla shell. Per impostazione predefinita FSL utilizza il formato immagine NIfTI_GZ, cioè il file NIfTI compresso (.nii, .nii.gz);
- AFNI (*Analysis of Functional Neuroimages*), è una libreria per l'elaborazione e la visualizzazione dei dati di Risonanza Magnetica funzionale. AFNI è un insieme di programmi che possono essere usati interattivamente o assemblati in modo flessibile con lo script di shell. AFNI gira sotto molti sistemi operativi, tra cui SGI IRIX, Solaris, Linux, FreeBSD e Mac OS X;
- FreeSurfer: è un pacchetto di software open source sviluppato dal *Martinos Centre for Biomedical Imaging* del *Massachusetts General Hospital*, per l'analisi automatica e la

visualizzazione delle strutture del cervello a partire dai dati di Risonanza Magnetica strutturale e funzionale. È disponibile gratuitamente e funziona su una vasta gamma di piattaforme hardware e software. FreeSurfer dispone di una serie di algoritmi per le proprietà funzionali, strutturali e di connessione del cervello umano. Il formato standard di FreeSurfer è MGH (e la sua forma compatta MGZ) che viene usato per memorizzare dati strutturali ad alta risoluzione;

- *ANTs (Advanced Normalization Tools)*: è un pacchetto di software open source, specifico per la normalizzazione e la segmentazione di immagini fMRI. Molti degli strumenti di registrazione sono di tipo SYN, ma sono disponibili anche deformazioni elastiche, la normalizzazione SYN “trasformazione simmetrica diffeomorfa” è parte del tool di ANTs. Per impostazione predefinita ANTs utilizza il formato immagine NIfTI_GZ, cioè il formato NIfTI compresso [29];
- *SPM (Statistical Parametric Mapping)*: è un software open source sviluppato in ambiente Matlab dal *Wellcome Trust Centre for Neuroimaging dell’University College of London*. SPM è stato creato per l’analisi di immagini cerebrali appartenenti a soggetti diversi o allo stesso soggetto ma seriate nel tempo. SPM utilizza il formato immagine NIfTI;
- *BrainVoyager* è un software che contiene tutto il necessario per l’analisi e la visualizzazione avanzate di dati strutturali e funzionali di Risonanza Magnetica. BrainVoyager utilizza il linguaggio C++ e un funziona su tutti i principali sistemi operativi per computer, inclusi Windows, Linux e Mac OS.

Tutti questi software rappresentano una libreria completa di strumenti per l’analisi di dati fMRI, MRI e DTI.

4.4 Pre-processamento dei dati

4.4.1 Conversione delle immagini e normalizzazione dell’intensità

Quando le immagini cerebrali MRI vengono acquisite, esse sono immagini DICOM, è quindi necessario eseguire una conversione nel formato NIfTI, considerato il nuovo formato standard per le immagini medicali e che può essere utilizzato nei programmi di analisi di immagini di RM come FSL, SPM, o FreeSurfer.

Le immagini acquisite presentano un artefatto tipico delle acquisizioni MRI: la variazione dell’intensità luminosa dei pixel in funzione della posizione; questo artefatto è dovuto principalmente

alle disomogeneità del campo magnetico statico B_0 e dell'impulso RF oltre che alla variabilità dell'anatomia dei soggetti. La variazione di intensità luminosa nei diversi pixel fa sì che uno stesso tipo di tessuto abbia un valore di intensità significativamente diverso in funzione della posizione spaziale.

Correggere quest'artefatto è molto importante quando alcune regioni presentano un basso segnale rispetto alle zone circostanti, come spesso accade ai lobi temporali a causa della posizione della testa del paziente nella bobina.

Per ovviare a questo inconveniente esistono almeno due algoritmi che permettono di ridurre l'effetto del gradiente di intensità:

- *N3*, utilizzato da FreeSurfer, è una normalizzazione non parametrica e non uniforme dell'intensità, tale normalizzazione è volta alla correzione della non uniformità dell'intensità dei dati. Questo approccio raggiunge prestazioni elevate senza il bisogno di supervisione e poiché richiede poche ipotesi sui dati può essere applicato nella fase iniziale di una qualunque analisi automatizzata;
- *N4BiasFieldCorrection*, utilizzato da ANTs, è una variante del precedente algoritmo N3 per la correzione degli artefatti dovuti alle disomogeneità del campo magnetico; è basato sull'assunzione che la variazione del campo di polarizzazione a bassa frequenza può essere modellata come una convoluzione tra una gaussiana e l'istogramma delle intensità [30].

4.4.2 Skull-Strip delle immagini

Molte applicazioni di brain imaging richiedono una precisa differenziazione tra tessuto cerebrale e tessuto non cerebrale. La robustezza delle registrazioni aumenta se le parti di tessuto non cerebrale vengono rimosse prima dell'esecuzione della registrazione; quindi, dopo la normalizzazione delle immagini occorre eseguire la rimozione dello scalpo dalle immagini acquisite.

Il software FSL utilizza BET (*Brain Extraction Tool*) [31], il vantaggio di questo algoritmo è di essere completamente automatizzato, inoltre, visto che ogni immagine del cervello è diversa dalle altre, ci sono alcuni parametri che possono essere regolati per ottenere un risultato migliore (immagini T1 e T2 pesate, densità protonica, EPI). L'algoritmo prevede una tassellazione triangolare fino a raggiungere la complessità desiderata e poi, una deformazione superficiale, triangolo per triangolo, per adattarsi alla superficie del cervello in esame, come mostrato in **Figura 18**. Nonostante l'algoritmo BET esegua un buon lavoro nell'estrazione del cervello, può capitare che alcune strutture di tessuto non cerebrale non vengano correttamente rimosse.

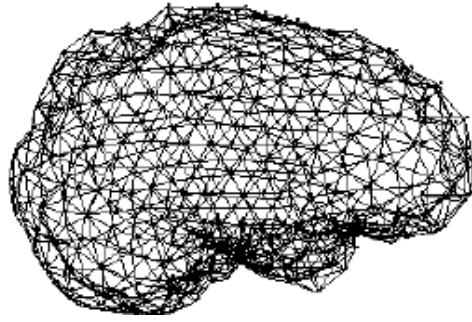


Figura 18 Esempio di tassellazione effettuata dall' algoritmo BET di FSL [31].

Per quanto riguarda FreeSurfer, il software per rimuovere lo scalpo è AUTORECON1 che prevede cinque step sequenziali al termine dei quali si ottiene l'immagine privata dello scalpo. In **Figura 19** sono illustrati i cinque step: al primo passo viene eseguita una correzione del movimento e l'immagine in ingresso acquisita con un certo numero di voxel e con una determinata risoluzione, viene modellata per avere lo stesso numero di voxel lungo le tre dimensioni. In **Figura 19.4** viene mostrata l'immagine dopo le due normalizzazioni, di intensità e spaziale, eseguite ai passi 3 e 4. Infine, in **19.5** viene mostrata l'immagine priva di scalpo ottenuta al passo cinque.

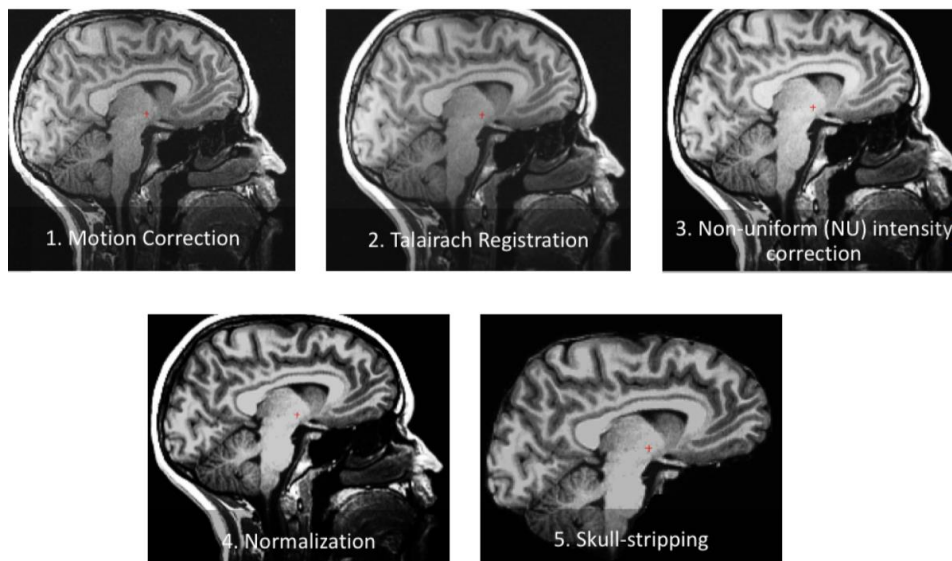


Figura 19 Illustrazione dei cinque step sequenziali al termine dei quali si ottiene l'immagine privata dello scalpo. Al passo 1 viene eseguita una correzione del movimento, al passo 2 si ha la registrazione all'atlante di Talairach, ai passi 3 e 4 si eseguono le normalizzazioni di intensità e spaziale e infine al passo 5 si esegue lo skull-strip dei dati [32].

Infine, il software AFNI utilizza 3dSkullStrip per rimuovere lo scalpo, lasciando solo il cervello, il cervelletto e il tronco encefalico. Il processo è completamente automatizzato e prevede l'espansione di una superficie sferica in maniera iterativa fino all'avvolgimento dell'intero cervello [33].

In **Figura 20** vengono mostrate le differenze tra lo skull-strip operato dai tre algoritmi sopra descritti; si può notare che FSL con BET e AFNI con 3dSkullStrip commettono errori maggiori nell'eliminare lo scalpo, in particolare si nota che AFNI **20b**) elimina parte del lobo frontale e BET **20c**) ha un livello di precisione minore nel delimitare tutto il contorno del cervello.

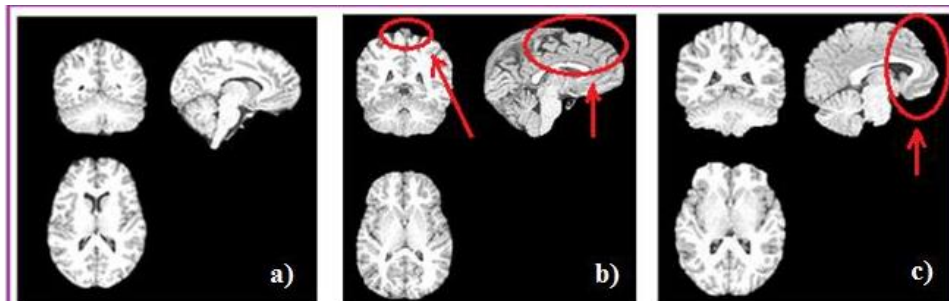


Figura 20 Immagini T1 pesate dopo aver rimosso lo scalpo mediante (a) FreeSurfer, (b) AFNI e (c) FSL.

4.4.3 Correzione dei movimenti

La correzione dei movimenti del capo (motion correction) occupa la maggior parte della procedura di preprocessing, dal momento che cerca di limitare la principale fonte degli errori di acquisizione. La correzione dei movimenti è un aspetto estremamente importante per l'analisi dei dati fMRI poiché anche il più piccolo movimento del paziente può indurre significativi artefatti: si pensi che già solo spostamenti della frazione del millimetro della testa del paziente possono generare variazioni del segnale del 2%. Quando il soggetto muove la testa, infatti, i neuroni appartenenti ad un certo voxel si spostano dalla posizione iniziale e quindi l'andamento del segnale nel tempo associato a quel voxel non è più rappresentativo di quel particolare gruppo di neuroni.

Per cercare di mantenere la testa del paziente quanto più immobile possibile sono stati costruiti diversi sistemi di immobilizzazione della testa, tuttavia, questo spesso non è sufficiente ad eliminare totalmente il movimento, specie quello involontario.

La procedura di correzione del movimento nel software FSL prende il nome di MCFLIRT, essa opera scegliendo un volume funzionale dell'acquisizione come volume di riferimento al quale vengono allineati tutti gli altri volumi. La maggior parte degli algoritmi di MCFLIRT descrive i movimenti del capo attraverso 6 parametri: 3 di traslazione lungo gli assi x , y e z , e 3 di rotazione attorno agli stessi (*roll*, *pitch* e *yaw*) che descrivono il moto dei corpi rigidi nello spazio tridimensionale. Questi 6 parametri vengono stimati iterativamente, calcolando ogni volta come il volume funzionale debba essere traslato e ruotato per meglio allinearsi al volume di riferimento. Successivamente si calcola la differenza tra i due volumi, quello considerato e quello preso come riferimento e il quadrato di tale differenza, per ridurre al minimo gli effetti dovuti al movimento della testa, deve essere minimizzato.

4.4.4 Normalizzazione spaziale

Solitamente, gli studi fMRI prevedono l'acquisizione di un certo numero di soggetti diversi, il cervello umano è diverso da un soggetto all'altro sia per le dimensioni che per la forma; l'obiettivo della normalizzazione spaziale è quello di deformare le singole acquisizioni in modo tale che una locazione nella scansione di un soggetto corrisponda alla stessa locazione nella scansione di un altro soggetto, cosicché i risultati siano tra loro facilmente integrabili e confrontabili: generalmente, quello che si fa, è allineare tutte le acquisizioni ad uno specifico atlante. Gli atlanti più usati sono l'atlante di *Talairach*, creato da Jean Talairach basandosi sul cervello del cadavere di una donna sessantenne, e l'atlante del *Montreal Neurological Institute* (MNI), creato basandosi sul calcolo di una media non lineare di molti cervelli di soggetti normali, entrambi gli standard sono mostrati in **Figura 21**. Questa procedura di allineamento tra immagini anatomiche e immagini funzionali prende il nome di registrazione.

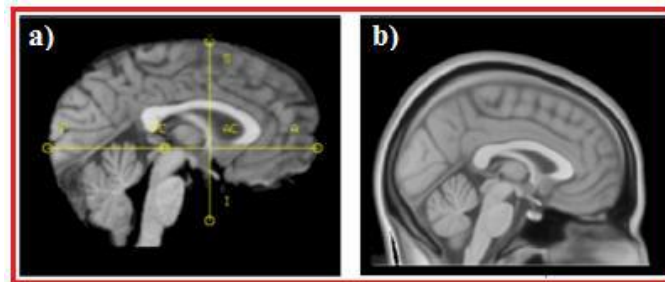


Figura 21 a) Atlante di Talairach, basato sulla dissezione post morte di un cervello di donna. b) MNI 152 costruito effettuando una media non lineare di molti cervelli di soggetti normali.

Sebbene la procedura di registrazione sia concettualmente simile a quella di correzione del movimento, non sono più sufficienti i 6 parametri che caratterizzano il moto di un corpo rigido nello spazio 3D, ma è necessaria l'introduzione di parametri aggiuntivi che caratterizzano il campo di deformazioni complessivo (comprendenti di compressioni e allungamenti). I principali vantaggi della normalizzazione sono legati alla possibilità di generalizzare i risultati su un numero elevato di soggetti e di migliorare il confronto tra diversi studi.

Gli algoritmi di registrazione delle immagini comprendono diversi modelli di trasformazione, la prima grande categoria include le trasformazioni lineari: traslazione, rotazione, scalatura e altre affini, queste trasformazioni sono globali, questo significa che non è possibile modellare delle differenze geometriche tra le immagini. La seconda grande categoria di trasformazioni comprende le trasformazioni elastiche, o non lineari: queste sono capaci di piegare localmente l'immagine da registrare per allinearla con l'immagine di riferimento.

In FSL per la registrazione delle immagini sono presenti due tools: FLIRT (FMRIB's Linear Image Registration Tool) e FNIRT (FMRIB's Non-linear Image Registration Tool).

FLIRT viene usato per allineare le immagini utilizzando solo trasformazioni lineari in 2D e 3D. In generale, il processo di registrazione termina quando si trova un massimo globale di una funzione di somiglianza, ma nel caso di FLIRT, invece di cercare un massimo di una funzione di somiglianza si cerca il minimo di una funzione di costo; una funzione di costo misura la precisione di un allineamento: un valore basso di essa indica un buon allineamento, viceversa un valore alto. Una caratteristica importante di FLIRT è che offre la possibilità di scegliere la funzione costo che si vuole usare, e una volta scelta esso ne troverà il minimo effettuando prove ripetute alla ricerca della soluzione migliore. Infine, tale strumento utilizza versioni a bassa risoluzione delle immagini iniziali per aumentare la velocità, offrendo così un compromesso tra velocità e robustezza.

FNIRT, invece, esegue la registrazione delle immagini utilizzando trasformazioni non lineari, il suo funzionamento è simile a FLIRT, ma effettua anche alcune trasformazioni non lineari per trovare il minimo della funzione di costo [34].

Un altro software molto efficiente per la registrazione delle immagini ad uno spazio standard è ANTs, questo software dispone di molti tools per eseguire vari tipi di trasformazioni dalle più semplici, rigida e affine, a quella più complessa, cioè trasformazione simmetrica diffeomorfa (SYN).

La trasformazione SYN è una deformazione elastica ma con più gradi di libertà; mentre la mappatura affine è adatta quando la differenza tra le immagini coinvolge solo la rotazione e la traslazione, altri dati richiedono mappature più deformabili per poter catturare le differenze tra le forme e garantire un buon allineamento delle immagini. Chiaramente, più una trasformazione è complessa e più aumenterà il tempo computazionale per produrla, tuttavia, seppur più lente, le registrazioni non lineari sono molto più precise di quelle rigide avendo a disposizione più parametri per modellare i cervelli dei pazienti a quello di riferimento.

In **Figura 22** è riportata la differenza tra una registrazione affine **22a)** e una diffeomorfa **22b)** di un'immagine anatomica T1-pesata allo spazio MNI; dalle aree evidenziate in rosso si nota come la registrazione non lineare sia più accurata di quella affine.

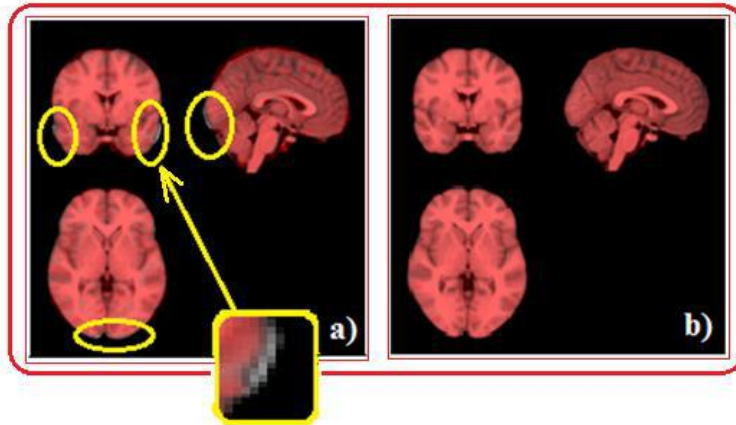


Figura 22 Registrazione di un immagine anatomica T1 pesata allo spazio MNI mediante registrazione affine a sinistra e mediante registrazione non lineare a destra. In particolare, è mostrata la sovrapposizione delle immagini anatomiche: la registrazione diffeomorfa è stata eseguita con ANTs (b), la trasformazione rigida con FSL, FLIRT (a). Si nota come la prima (b) sia più accurata della seconda (a).

4.4.5 Coregistrazione

In generale, gli studi fMRI in resting state, prevedono l'acquisizione di molte immagini funzionali insieme ad una immagine strutturale. L'immagine strutturale è a maggior risoluzione spaziale rispetto all'immagine funzionale che deriva dal segnale BOLD. Per delimitare e riconoscere con precisione le regioni di interesse all'interno dell'immagine funzionale per poter interpretare i risultati e capire a quali regioni cerebrali i voxel attivi fanno parte, è necessario allinearla con quella strutturale T1-pesata.

Tramite il processo di coregistrazione si provvede al riallineamento delle immagini funzionali (T_2^* -pesate) sulla corrispondente immagine anatomica (T1-pesata); l'obiettivo è quello di sovrapporre le informazioni contenute nelle immagini funzionali su un'immagine dove è possibile discriminare le varie regioni anatomiche.

Le immagini funzionali, dopo essere state corrette per i movimenti della testa del paziente e quindi tutte allineate rispetto ad un volume funzionale di riferimento, devono essere registrate all'immagine strutturale T1-pesata, che a sua volta è stata registrata all'atlante MNI. Eseguendo questo procedimento per ogni volume funzionale, si esegue una registrazione di tutte le immagini funzionali allo spazio standard.

L'immagine anatomica T1-pesata viene registrata al template MNI prima tramite una trasformazione lineare, e poi tramite una trasformazione non lineare. Dalla prima registrazione deriva una matrice di trasformazione che rappresenta il passaggio di coordinate dallo spazio in cui è stata acquisita l'immagine allo spazio standard MNI, dalla seconda invece derivano tre immagini di deformazione nelle tre direzioni che rappresentano le deformazioni subite dell'immagine di partenza per

sovrapporsi allo spazio standard. Ogni volume funzionale dopo essere stato corretto per il moto, viene registrato all'immagine strutturale mediante trasformazione non lineare, l'immagine risultante viene registrata allo spazio standard MNI a bassa risoluzione, questo procedimento viene ripetuto per tutti i 360 volumi funzionali di ogni paziente.

In **Figura 23** è illustrata l'efficienza dell'algoritmo di coregistrazione: a sinistra è rappresentata un'immagine funzionale prima della registrazione nello spazio in cui è stata acquisita, a sinistra dopo la registrazione allo spazio standard MNI.

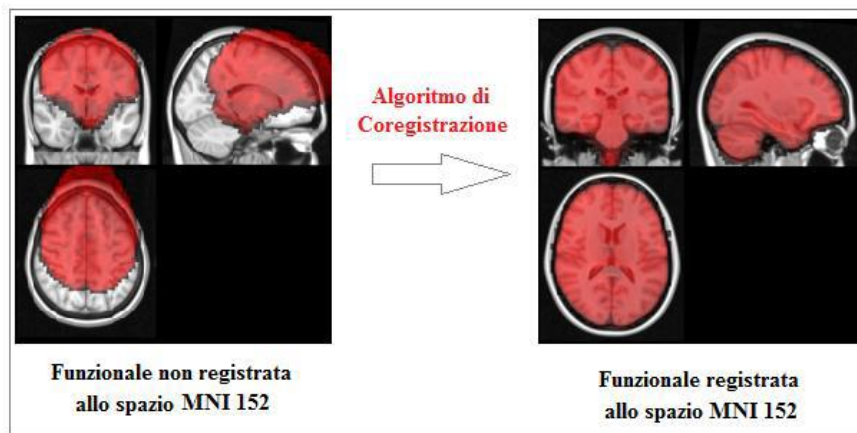


Figura 23 A sinistra è riportata l'immagine funzionale dopo essere stata corretta dai movimenti e skull-stripped, è acquisita in uno spazio completamente diverso dallo spazio standard. Per confrontare più soggetti occorre eseguire una coregistrazione per riportare tutti i volumi funzionali ad uno spazio comune: MNI 152. A destra il risultato dell'algoritmo di coregistrazione, cioè l'immagine funzionale registrata allo spazio standard MNI 152.

Discussioni e Conclusioni

Lo scopo di quest'elaborato è stato quello di illustrare le principali tecniche di analisi della connettività interemisferica strutturale e funzionale tramite Tensore di Diffusione e Risonanza Magnetica Funzionale in resting state.

Per l'analisi della connettività funzionale sono disponibili approcci e linee di pensiero alternativi, il General Linear Model è una tecnica che consiste nel fare delle assunzioni a priori sugli andamenti spazio-temporali del segnale BOLD contenuto nei dati: è un modello di regressione lineare che esprime i dati come una combinazione lineare di variabili indipendenti, più un termine additivo dovuto al rumore. Il limite di questa metodologia, che viene poi superato nella tecnica ICA, è dato dal fatto che, trattandosi di dati a riposo, potrebbero essere presenti delle fonti di variabilità non note o che comunque non possono essere stimate a priori e che quindi porterebbero a dei risultati scorretti.

L'Analisi delle Componenti Indipendenti, invece, è una tecnica che, partendo dal segnale registrato, permette di ricavare le sorgenti originali, spaziali e temporali, sfruttando l'assunzione di indipendenza statistica e non gaussianità delle sorgenti: la tecnica ICA è, per questo motivo, ottimale nello studio della connettività funzionale interemisferica dell'encefalo, dal momento che le componenti dei segnali sono generate da processi indipendenti, come lo sono i processi neuronali del cervello. Poiché nella tecnica ICA non è previsto un modello per rappresentare il rumore, può succedere che trascurare quest'ultimo causi una stima imprecisa delle dimensioni delle sorgenti, con conseguente overfitting del segnale: dover fittare con un modello non rumoroso un segnale rumoroso, può portare alla generazione di troppe componenti in uscita con il rischio di non riuscire ad identificare più il segnale di interesse. Per superare queste problematiche è stata introdotta la tecnica PICA (Probabilistic Independent Component Analysis), che introduce nel modello ICA classico un termine di rumore additivo e gaussiano; in questo modo, tramite opportune matrici, è possibile risalire, con buona approssimazione, ai valori delle sorgenti originali.

Nell'ambito di tali tecniche, per quanto riguarda la parte di pre-processing, esistono numerosi software per l'elaborazione delle immagini di rs-fMRI, come FSL, AFNI, FreeSurfer, ANTs, SPM e BrainVoyager, e sebbene i diversi algoritmi messi a disposizione da ciascuna di queste librerie portino a dei risultati simili, può accadere che in specifici contesti sperimentali alcuni di essi siano da preferire rispetto a degli altri; ad esempio, per quanto riguarda lo skull-strip delle immagini si è visto che AUTORECON1 di FreeSurfer commette un minor numero di errori nella rimozione del tessuto non

cerebrale e che pertanto è da preferirsi rispetto ad altri algoritmi come BET di FSL o 3dSkullStrip di AFNI che rispettivamente rimuovono parte del lobo frontale e hanno un livello di precisione minore nel delimitare il contorno dell'intero cervello.

In conclusione, il principale vantaggio degli studi di connettività interemisferica funzionale e strutturale in resting state sta nel fatto che, non essendoci dei task specifici richiesti in fase di esecuzione del test, possono essere condotti in soggetti incapaci di sottoporsi a particolari paradigmi sperimentali e non risentono del problema della dipendenza dei risultati dall'impostazione del test stesso. Inoltre, l'approccio in resting state è molto utile per visualizzare e confrontare eventuali difformità nell'attivazione delle aree cerebrali sia in soggetti sani che in soggetti patologici: alle alterazioni delle RSNs sono, infatti, attribuibili patologie e disturbi che interessano il sistema nervoso, come per esempio la malattia di Alzheimer, la sclerosi multipla, l'epilessia, alcune forme di autismo e la sindrome da deficit di attenzione e iperattività. Ed è proprio in questo ambito, cioè nello studio delle alterazioni alle RSNs in malattie neurologiche, neurodegenerative e nei disturbi psichici, che le analisi di connettività funzionale con rs-fMRI rappresentano una via di sviluppo futura in campo medico, nel senso che possono contribuire, in maniera significativa, agli studi delle patologie sopracitate che sono ancora oggi per certi aspetti sconosciute e oggetto di continua ricerca medica.

Bibliografia

- [1] Treccani, Enciclopedia Libera. Struttura e funzione del cervello. https://www.treccani.it/enciclopedia/struttura-e-funzione-del-cervello_%28Dizionario-di-Medicina%29. 09/2022.
- [2] Guyton e Hall. Fisiologia Medica. EDRA. 2016.
- [3] L. J. Garey. Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex. Springer. 2006.
- [4] W. Penny, K. J. Friston, J. Ashburner, S. Kiebel, T. Nichols. Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images. Elsevier/Academic Press. 2007.
- [5] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessel. Principi di Neuroscienze, 2nd Edition. CEA. 1994.
- [6] A. L. Beer, T. Plank, M. W. Greenlee. Diffusion tensor imaging shows white matter tracts between human auditory and visual cortex. Experimental Brain Research (2011).
- [7] R. Brown. A brief account of microscopical observations made in the month on June, July and August 1828 on the particles contained in the pollen of plants and on the general existance of actives molecules in organic and inorganic bodies. Philosophical Magazine (1828); Volume 4.
- [8] D. Le Bihan, E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis, M. Laval-Jeantet. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. Radiology (1986); Volume 161: No. 2, p. 401-407.
- [9] <https://biomedicalcue.it/risonanza-magnetica-dti-importante-strumento-imaging-biomedico/28170/>. 10/2022
- [10] Fondazione Humanitas per la Ricerca, Enciclopedia, Risonanza magnetica con tensore di diffusione (DTI) o Trattografia, <https://fondazionehumanitasricerca.it/enciclopedia/visite-ed-esami/risonanza-magnetica-con-tensore-di-diffusione-dti-o-trattografia/>. 09/2022.
- [11] K. J. Friston, C. D. Frith, P. F. Liddle, R. S. Frackowiak. Functional Connectivity: The Principal-Component Analysis of Large (PET) Data Sets. Journal of cerebral blood flow and metabolism (1993); p. 5-14.
- [12] N. Ramnani, e altri. New approaches for exploring anatomical and functional connectivity in the human brain. Biological Psychiatry (2004); Volume 56: Issue 9.
- [13] M. Coriasco, O. Rampado, G. B. Bradac. Elementi di Risonanza Magnetica. Springer Verlag. 2013.
- [14] S. A. Huettel, A. W. Song, G. McCarthy. Functional magnetic resonance imaging, Sinauer Associates Sunderland (2004); Volume 1.
- [15] S. Ogawa, Tso-Ming Lee, A. R. Kay, D. W. Tank. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. Proceedings of the National Academy of Sciences (1990); 9868–9872.

- [16] M. D. Fox, A. Z. Snyder, J. L. Vincent, M. E. Raichle. Intrinsic fluctuations within cortical systems account for intertrial variability in human behavior. *Neuron* (2007).
- [17] B. Biswal, F. Z. Yetkin, V. M. Haughton, J. S. Hyde. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri. *Magnetic Resonance in Medicine* (1995); Volume 34: p. 537-541.
- [18] F. Agosta, M. Pievani, C. Geroldi, M. Copetti, G. B. Frisoni, M. Filippi. Resting state fMRI in Alzheimer's disease: beyond the default mode network. *Neurobiologia dell'invecchiamento* (2011); Volume 33, Numero 8.
- [19] A. Tessitore, M. Amboni, F. Esposito, e altri. Resting-state brain connectivity in patients with Parkinson's disease and freezing of gait. *Parkinsonism & Related Disorders* (2012); Volume 18: Issue 6.
- [20] J. F. Sumowski, V. M. Leavitt. Cognitive reserve in multiple sclerosis. *SAGE journals* (2013); Volume 19: Issue 9.
- [21] D. M. Cole, S. M. Smith, C. F. Beckmann. Advanced and pitfalls in the analysis and interpretation of resting state fMRI data *Frontiers in System Neuroscience* (2010); Volume 4: Issue 8.
- [22] C. F. Beckmann, S. M. Smith. Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* (2004); Volume 23: Issue 2.
- [23] K. J. Worsley, K. J. Friston. Analysis of fMRI time-series revisited—again. *Neuroimage* (1995); Volume 2: Issue 3, p. 173-181.
- [24] A. Hyvärinen, E. Oja. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural networks* (2000); Volume 13: Issue 4-5, p. 411-430.
- [25] G. R. Naik, D. K. Kumar. An overview of independent component analysis and its applications. *Informatica: An International Journal of Computing and Informatics* (2011).
- [26] A. Hyvärinen, E. Oja. A fast fixed-point algorithm for independent component analysis. *Neural computation* (1997); Volume 9: Issue 7, p. 1483-1492.
- [27] C. F. Beckmann, M. DeLuca, J. T. Devlin, S. M. Smith. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (2005).
- [28] C. M. Bishop. *Neural networks for pattern recognition*. Clarendon Press. 1995.
- [29] B. B. Avants, N. J. Tustison, G. Song, P. A. Cook, A. Klein, J. C. Gee. A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. *Neuroimage* (2011); Volume 54: Issue 3, p. 2033-2044.
- [30] N. J. Tustison, B. B. Avants, P. A. Cook, Y. Zheng, A. Egan, P. A. Yushkevich, J. C. Gee. N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging* (2010); Volume 29: Issue 6.
- [31] S. M. Smith. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping* (2002); Volume 17: Issue 3, p. 143-155.
- [32] <https://www.catcamacho.net/freesurfer-class>. 10/2022.

[33] P.Kalavathi, V. B. Surya Prasath. Methods on Skull Stripping of MRI Head Scan Images-a Review. Journal of Digital Imaging (2016); Volume 29: Issue 3.

[34] <https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FNIRT>.