UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

Analisi della connettività interemisferica mediante il toolbox SPM

Analysis of the intheremispheric connectivity through SPM toolbox

Relatore

Prof.ssa Laura Burattini

Candidato

Tommaso Marcantoni

Correlatori

Prof.ssa Mara Fabri

Dott.ssa Ilaria Marcantoni

Anno Accademico 2022/2023

Abstract

Il seguente lavoro di tesi ha voluto esplorare il funzionamento del sistema nervoso centrale sfruttando la condizione patologica di un **paziente split-brain**, ovvero un soggetto sottoposto a resezione chirurgica del corpo calloso (CC), principale via di comunicazione interemisferica. Studi precedenti rivolti alla comprensione della dominanza cerebrale hanno portato alla luce sintomatologie che rispecchiano l'atipicità di questi pazienti nello svolgimento di azioni quotidiane. La condizione patologica genera, inoltre, evidenze quantificabili in termini di **connettività strutturale** (SC), intesa come la presenza di connessioni anatomiche tra regioni cerebrali, di **connettività funzionale** (FC), la dipendenza statistica tra eventi neurofisiologici distanti tra loro e di **connettività effettiva** (EC), definita come interazione causale tra aree della corteccia cerebrale. L'analisi della FC può essere condotta acquisendo immagini di risonanza magnetica funzionale (**fMRI**) che permettono di ottenere segnali elettrici misurabili dipendenti dal livello di ossigenazione del sangue (**segnali BOLD**). Dal momento che nello stato di riposo il cervello appare molto attivo, consentendo di osservare diverse resting-state (rs) network (**RSN**), ovvero regioni cerebrali (ROI) funzionalmente connesse tra loro, è conveniente acquisire immagini di fMRI allo stato di riposo. Nella presente tesi sono stati analizzati dati di pazienti sani prelevati da database open-source e successivamente dati fMRI acquisiti allo stato di riposo di un soggetto sano e di un paziente split-brain. I dati sono stati elaborati per prepararli all'analisi di connettività (**preprocessing**) e ridurre i rumori fisiologici e strumentali (**denoising**) in quanto questi potrebbero influire pesantemente nei risultati ottenuti. Il toolbox CONN permette di effettuare le procedure di preprocessing, denoising e analisi di connettività e di ottenere **mappe** di FC basate sui semi (**SBC**), in cui ad ogni voxel è associato un valore di FC con le regioni cerebrali selezionate, **matrici** di FC basate sulle ROI (**RRC**), che

restituiscono la FC tra ciascuna coppia di regioni cerebrali selezionate. Inoltre, applicando il metodo del Dynamic Causal Modelling (**DCM**), una volta specificato il modello di connettività della network di interesse, è possibile studiare la EC per investigare la causalità delle interazioni. I risultati ottenuti risultano concordi con la letteratura per quanto concerne le mappe SBC e matrici RRC, nelle quali notiamo assente o scarsa FC tra le regioni **omotopiche**, cioè speculari tra i due emisferi, di tutte le RSN con un'eccezione per la corteccia sensorimotoria, compatibilmente alla presenza di **percorsi assonali alternativi** al CC. L'applicazione di un modello di EC completamente connesso della principale RSN, la Default Mode Network (DMN), ha restituito per il soggetto sano parametri concordi con investigazioni precedenti su soggetti controllo e anomalie nel paziente split-brain. Future ricerche potrebbero sviluppare lo studio della EC nel paziente split-brain per le altre RSN e testare diverse configurazioni di comunicazione tra ROI. I risultati ottenuti rimarcano l'**importanza** del **CC** per la FC interemisferica, corroborano l'ipotesi della partecipazione alla stessa di **ulteriori vie** di comunicazione interemisferiche e vanno nella direzione di cogliere i particolari della **complessa elaborazione cerebrale.**

Indice

INTRODUZIONE ..... **I**

1 LA STRUTTURA CONNETTIVA NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE **10**

1.1 ORGANIZZAZIONE CELLULARE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE 11

1.1.1 Il Neurone *12*

1.1.2 La trasmissione del segnale elettrico *13*

1.2 IL CERVELLO 13

1.2.1 La Corteccia Cerebrale *13*

1.2.2 Il Corpo Calloso *15*

1.2.3 La callosotomia *15*

1.2.4 La dominanza cerebrale *16*

1.2.5 Agenesia del Corpo Calloso *18*

1.3 FUNZIONI SUPERIORI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE 19

2 LA CONNETTIVITÀ INTEREMISFERICA **20**

2.1 LA CONNETTIVITÀ STRUTTURALE 21

2.1.1 La microstruttura anatomica delle connessioni *22*

2.1.2 La macrostruttura anatomica delle connessioni *24*

2.1.3 La neuroplasticità *26*

2.2 LA CONNETTIVITÀ FUNZIONALE 26

2.2.1 La connettività strutturale condiziona la funzionalità *28*

2.3 LA CONNETTIVITÀ EFFETTIVA 30

3 MATERIALI **32**

3.1 RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE 32

3.1.1 Principi fisici di Risonanza Magnetica *32*

3.1.2 Formazione delle immagini di Risonanza Magnetica *36*

3.1.3 Fisiologia del segnale BOLD *39*

3.1.4 Configurazioni sperimentali ... *39*

3.1.5 Resting State Networks ... *40*

3.2 ACQUISIZIONE DEI DATI ... 41

3.2.1 Sorgenti di rumori nei dati ... *42*

3.2.2 Database Reale ... *43*

4 METODI ... 44

4.1 PREPROCESSING ... 44

4.1.1 Fasi principali del preprocessing ... *44*

4.1.2 Regressione lineare multipla e General Linear Model ... *46*

4.1.3 Nuisance regression ... *47*

4.2 INDIPENDENT COMPONENT ANALYSIS ... 48

4.2.1 Classificazione manuale delle componenti indipendenti ... *51*

4.2.2 Classificazione automatica delle componenti indipendenti ... *51*

4.3 ANALISI DELLA CONNETTIVITÀ FUNZIONALE ... 52

4.3.1 Analisi voxel-based ... *52*

4.3.2 Analisi probabilistica delle componenti indipendenti ... *54*

4.4 SOFTWARE SPM ... 54

4.4.1 Il toolbox CONN ... *55*

4.4.2 Setup ... *55*

4.4.3 Denoising ... *61*

4.4.4 Analisi di primo livello ... *62*

4.4.5 Confronto analisi ROI-to-ROI tra soggetto sano e paziente split-brain ... *64*

4.4.6 Analisi della connettività effettiva con Spectral Dynamic Causal Modelling ... *65*

5 RISULTATI ... 68

5.1 RISULTATI DELL'ANALISI GUIDATA SU UN DATABASE OPEN SOURCE ... 68

5.2 RISULTATI DELL'ANALISI SU UN SOGGETTO SANO ... 71

5.3 RISULTATI DELL'ANALISI SUL PAZIENTE SPLIT BRAIN ... 76

5.4 RISULTATI DEL CONFRONTO DELLE ANALISI ROI-TO-ROI TRA SOGGETTO SANO E PAZIENTE SPLIT-BRAIN ... 80

5.5 RISULTATI DEL DYNAMIC CAUSAL MODELLING SU UN DATABASE OPEN SOURCE 82

6 DISCUSSIONE 85

CONCLUSIONE II

BIBLIOGRAFIA III

RINGRAZIAMENTI X

Lista delle Figure

Figura 1: Organizzazione cellulare del Sistema Nervoso Centrale [3] *11*

Figura 2: Rappresentazione grafica di un neurone. L'interruzione dell'assone indica che gli assoni possono estendersi fino a 10000 volte il diametro del corpo cellulare [3] *12*

Figura 3: Lobi del cervello umano *14*

Figura 4: Tecnica utilizzata per lo studio della dominanza emisferica nei soggetti split-brain. Al soggetto viene chiesto di fissare il centro dello schermo, sul quale vengono proiettate le immagini. Se un'immagine viene proiettata nel campo visivo sinistro, produce una replica dell'immagine nell'emisfero destro e viceversa. Il soggetto può anche afferrare, ma non vedere degli oggetti posti al di là di uno schermo e riconoscerli attraverso il tatto. [1] *17*

Figura 5: A sinistra un modello esemplificativo di kissing e fanning. A destra, un esempio di trattografia dello splenio del corpo calloso che evidenzia le stesse limitazioni *24*

Figura 6: Ricostruzione trattografica delle connessioni neurali tramite MRI. *25*

Figura 7: Traiettoria del vettore magnetizzazione nel ritorno allo stato di equilibrio *34*

Figura 8: Sequenza di formazione dell'immagine *37*

Figura 9: La scelta di TE e TR determina il contrasto dell'immagine. Si osserva che la combinazione di un TE lungo e un TR corto produce un basso control-to-noise ratio [17]. *38*

Figura 10: Otto delle RSNs più comuni. (A) Corteccia visiva primaria; (B) Corteccia visiva extrastriata; (C) Corteccia uditiva e altre cortecce di associazione sensoriale; (D) Corteccia somatomotoria; (E) DMN; (F) Rete implicata nel controllo esecutivo; (G, H) Reti fronto-parietali, lateralizzate a destra e a sinistra, implicate nei processi cognitivi attentivi [22]. *41*

Figura 11: Immagini anatomiche (a sinistra) e funzionali (a destra) delle sezioni frontale, sagittale e trasversale del cervello. *43*

Figura 12: Mappa dei coefficienti β risultanti dall'applicazione del modello GLM [20] *47*

Figura 13: Rappresentazione schematica della spatial ICA [27]. *50*

Figura 14: Interfaccia CONN per la definizione dei parametri iniziali. *57*

Figura 15: Interfaccia per l'inserimento delle immagini anatomiche, a sinistra e funzionali, a destra. Sono riprodotte la prima e l'ultima slice delle immagini funzionali acquisite in modo tale che si possano notare eventuali artefatti o movimenti importanti tra l'inizio e la fine dell'acquisizione..... 57

Figura 16: Step inclusi nella pipeline del preprocessing di default..... 58

Figura 17: Interfaccia per la selezione dell'ordine di acquisizione delle slice..... 58

Figura 18: Interfaccia per la scelta della soglia di identificazione degli outlier. La soglia consigliata è il 97 percentile, ma si può adottare una soglia più restrittiva, 95 percentile, o più rilassata, 99 percentile. 59

Figura 19: Inferaccia per la scelta delle opzioni di segmentazione, normalizzazione e ricampionamento. Se si vuole diminuire la risoluzione di campionamento delle immagini strutturali e funzionali, ad esempio per occupare meno memoria sul disco, si può aumentare il valore nei campi corrispondenti..... 60

Figura 20: Interfaccia per la selezione della dimensione del Kernel di smoothing. 60

Figura 21: A sinistra un modello schematico completamente connesso dei collegamenti diretti tra le regioni della DMN [36]. A destra, la matrice A implementata nel DCM che rappresenta le connessioni estrinseche tra le regioni in forma matriciale (riadattata da [37])..... 67

Figura 22: In alto a sinistra l'immagine anatomica è ben allineata al template MNI (in giallo). Adiacente alla suddetta i tessuti cerebrali estratti dalla segmentazione, da sinistra a destra la sostanza bianca, la materia grigia e il liquido cefalorachidiano. In basso le distribuzioni di connettività prima e dopo il denoising [38]. 68

Figura 23: Mappe SBC dell'attivazione cerebrale rispetto alle ROI della default mode network, nel soggetto prelevato dal database open source. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le seguenti ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). Il valore di connettività è codificato da un colore dall'azzurro, correlazione negativa, al rosso, correlazione positiva. Sono visibili solo correlazioni associate ad un valore maggiore di 0.25 o minore di -0.25. 69

Figura 24: Matrice RRC del soggetto sano prelevato dal database open source. La barra cromatica mostra la codifica di colore utilizzata, rosso per correlazioni fortemente positive e blu per correlazioni fortemente negative. Sull'asse y sono indicate le R..... 71

Figura 25: Controllo qualità del preprocessing e denoising sul soggetto sano. In alto a sinistra l'allineamento dell'immagine anatomica al template MNI, a destra i tessuti cerebrali estratti e in basso le distribuzioni della connettività prima e dopo il denoising..... 72

Figura 26: Mappe SBC per il soggetto sano rispetto alle ROI della default mode network. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). Il colore azzurro codifica per un valore negativo di connettività mentre il rosso per una correlazione positiva. Valori di connettività nell'intervallo [-0.25; 0.25] non sono mostrati..... 73

Figura 27: Matrice RRC per il soggetto sano. La colorazione degli elementi della matrice segue la codifica espressa dalla barra cromatica, rosso per correlazioni, tra coppie di ROI, fortemente positive e blu per correlazioni fortemente negative. Sull'asse y sono indicate le ROI costituenti delle otto reti cerebrali considerate. 74

Figura 28: Matrice mRRC, per il soggetto sano. La codifica cromatica (colore rosso per correlazione positiva e blu per correlazione negativa) è indicata dalla barra cromatica. Sull'asse y le ROI ordinate per appartenenza alle rispettive network. Le frecce di colore nero segnalano la presenza di elementi della matrice associati a coppie di ROI speculari. 75

Figura 29: In alto a sinistra l'immagine strutturale allineata al template MNI, a destra i tessuti cerebrali e in basso le distribuzioni della connettività prima e dopo il denoising..... 76

Figura 30: Mappe SBC del paziente split-brain rispetto alle ROI della default mode network. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). La connettività è codificata con un colore dall'azzurro, per valori negativi di connettività, al rosso, per valori positivi. Valori di connettività nell'intervallo [-0.25; 0.25] sono esclusi dalla visualizzazione..... 77

Figura 31: Matrice RRC per il paziente split-brain. Il colore degli elementi della matrice tende al rosso, in corrispondenza di coppie di ROI correlate positivamente, e al blu, in corrispondenza di coppie di ROI correlate negativamente. Sull'asse y le etichette che riportanto i nomi delle ROI appartenti alle otto resting state network considerate..... 78

Figura 32: Matrice mRRC per il paziente split-brain che mostra la connettività funzionale tra le coppie ROI costituenti le otto reti cerebrali allo stato di riposo. Una codifica cromatica che associa un colore tendente al rosso agli elementi che indicano correlazione positiva e un colore tendente al blu agli elementi che indicano correlazione negativa. 79

Figura 33: Matrice Zdiff ottenuta tramite normalizzazione delle matrici RRC e differenza tra soggetto sano e paziente. La codifica cromatica associa un colore tendente al rosso a valori più positivi e un colore tendente al blu a valori più negativi. Sugli assi sono riportate le ROI costituenti le principali otto resting state networks..... 81

Figura 34: Risultati del DCM per il soggetto prelevato dal database open source. A sinistra la stima dei parametri della matrice A. Per distinguere le regioni, è stato associato un colore ad ognuna: blu, rosso, giallo e viola rispettivamente per PCC, mPFC, LIPC, RIPC. A destra la probabilità a posteriori dei parametri ottenuti. 83

Figura 35: Risultati del DCM per il soggetto sano, in alto, e per il paziente split-brain, in basso. In entrambi i casi, sulla sinistra la stima dei parametri della matrice A, sulla destra la probabilità a posteriori dei parametri ottenuti. Per distinguere le regioni, è stato associato un colore ad ognuna: blu, rosso, giallo e viola rispettivamente per PCC, mPFC, LIPC, RIPC. 84

Introduzione

Fin dall'antichità gli uomini hanno cercato di comprendere il funzionamento di quella che potremmo definire la più complessa e intrigante macchina esistente: il cervello umano. I suoi miliardi di neuroni sono finemente collegati da innumerevoli connessioni neurali che permettono al cervello di guidare ogni aspetto del pensiero, delle emozioni e delle azioni umane. Gli studi sulla connettività interemisferica sono volti proprio alla comprensione dell'intricata rete di connessioni cerebrali tra gli emisferi dal punto di vista anatomico e funzionale; entrambi gli aspetti sono strettamente legati poiché la struttura anatomica condiziona ed è a sua volta condizionata dalla funzionalità delle connessioni. Questa relazione si riscontra in modo eloquente nel caso di pazienti che subiscono una resezione chirurgica della principale via di comunicazione interemisferica, il corpo calloso. Lo scopo della tesi è quello di analizzare la connettività funzionale di un soggetto sano e confrontarla con quella di un paziente che ha subito la resezione chirurgica del corpo calloso ed in particolare evidenziare eventuali differenze tra le reti cerebrali attive nello stato di riposo. Per fare ciò verranno analizzate sequenze di immagini cerebrali, acquisite tramite risonanza magnetica, con software di elaborazione come SPM e CONN.

1 La struttura connettiva nel Sistema Nervoso Centrale

Il Sistema Nervoso (SN) è un complesso aggregato di cellule, tessuti e organi che controlla la risposta del corpo umano agli stimoli interni ed esterni; esso può essere topograficamente suddiviso in Sistema Nervoso Periferico (SNP) e **Sistema Nervoso Centrale** (SNC). Il SNP comprende una componente sensoriale che raccoglie gli stimoli ambientali, attraverso organi di ricezione sensoriale, e li trasporta, mediante fibre nervose afferenti, al SNC e una componente motoria, costituita da motoneuroni somatici e neuroni pre- e postgangliari. Il SNC è composto dal midollo spinale e dal cervello ed è direttamente responsabile delle funzioni nervose superiori che caratterizzano l'uomo. Funzionalmente, il SN si divide in Sistema Nervoso Somatico (SNS), controllato volontariamente, e Sistema Nervoso Autonomo (SNA), indipendente dalla volontà dell'uomo. Si considera, infine, una suddivisione del SNA in parasimpatico, simpatico ed enterico. Il sistema parasimpatico si attiva durante azioni di routine e di rilassamento, mentre il sistema simpatico agisce in condizioni di emergenza [1] [2].

1.1 Organizzazione cellulare del Sistema Nervoso Centrale

La struttura cellulare del SNC, *Figura 1*, consiste in una rete di comunicazione cellulare, formata dai neuroni, e una matrice di supporto. Tra cellule di supporto, o neuroglia, troviamo gli **astrociti**, preposti al mantenimento di un ambiente ottimale per i neuroni, gli **oligodendrociti**, cruciali per la produzione del rivestimento mielinico assonale, e la **microglia**, che rimuove i prodotti di disgregazione cellulare. Le strutture del SNC sono separate dai ventricoli, cavità che contengono il liquido cerebrospinale, mediante un epitelio di **cellule ependimali** [1].

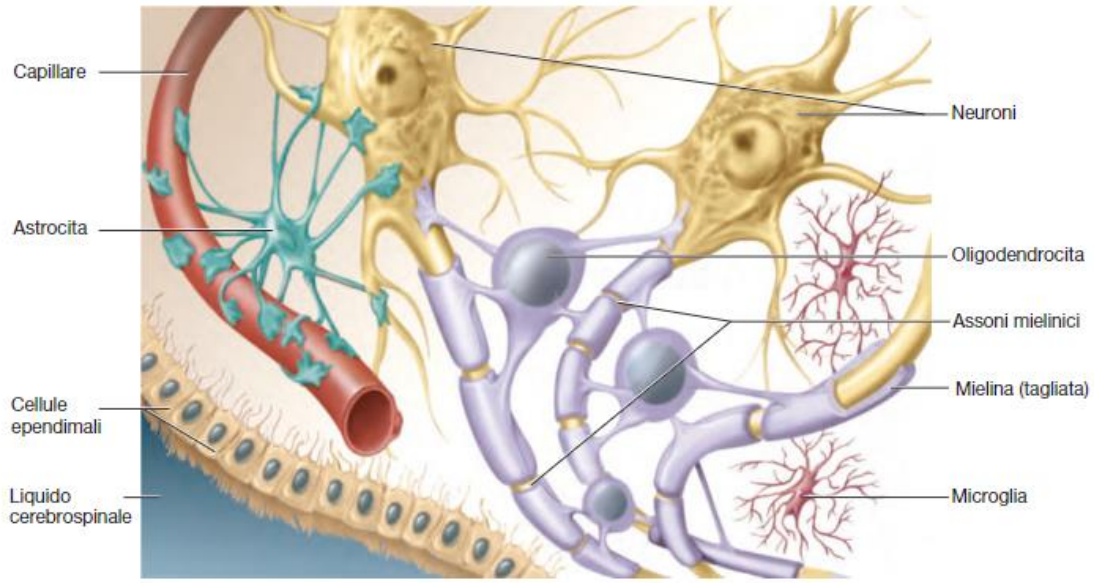


Figura 1: Organizzazione cellulare del Sistema Nervoso Centrale [3]

1.1.1 Il Neurone

L'unità strutturale e funzionale del SNC è il **neurone**, cellula specializzata nel ricevere, integrare e trasmettere segnali a cellule effettrici o ad altri neuroni. Come illustrato nella *Figura 2*, i neuroni possiedono un corpo cellulare, o soma, un numero variabile di dendriti, estensioni del corpo cellulare che trasmettono segnali verso il soma, e un assone, che trasferisce impulsi dal soma alle cellule riceventi. In base alla loro morfologia si dividono in piramidali, fusiformi e granulari. [1]. Nel processo di genesi e sviluppo dei neuroni si osserva che, dopo la crescita e proiezione degli assoni, fino al 70 % dei neuroni va incontro ad apoptosi[1]. Al momento non si conoscono le ragioni alla base di questo processo ma si ipotizza che possa consentire al sistema nervoso di affinare la sua connettività. La rete di comunicazione neurale non è, infatti, immutabile ma modifica la sua struttura e funzioni in risposta a stimolazioni o danni, capacità nota come **plasticità** [3].

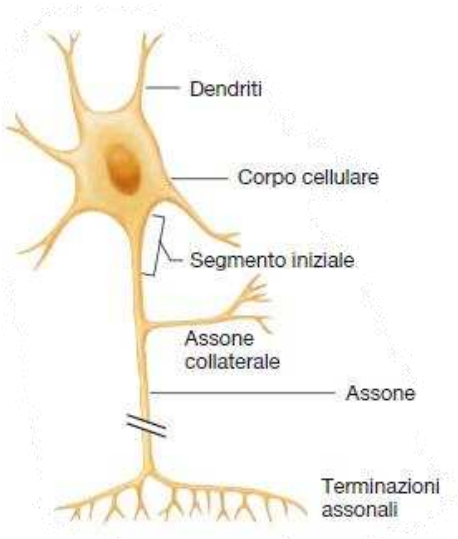


Figura 2: Rappresentazione grafica di un neurone. L'interruzione dell'assone indica che gli assoni possono estendersi fino a 10000 volte il diametro del corpo cellulare [3]

[1] Processo di morte cellulare programmata

1.1.2 La trasmissione del segnale elettrico

Tutti i neuroni sono cellule eccitabili, cioè in grado di trasmettere segnali elettrici. Il segnale elettrico, sotto forma di **potenziale d'azione**[2], si propaga lungo l'assone del neurone fino alla terminazione assonale. La regione in cui avviene la trasmissione dello stimolo al neurone ricevente si dice **sinapsi** e può essere di tipo elettrico o chimico. Le sinapsi elettriche permettono una rapida trasmissione del segnale mentre quelle chimiche, attraverso il rilascio di neurotrasmettitori[3], possono provocare un'inibizione, detta potenziale postsinaptico inibitorio, o un'eccitazione, detta potenziale postsinaptico eccitatorio della membrana del neurone ricevente. Ogni neurone possiede migliaia di sinapsi, delle quali alcune centinaia possono attivarsi simultaneamente o in tempi molto vicini. Di conseguenza, si verifica un fenomeno di **integrazione sinaptica**, nel quale potenziali inibitori ed eccitatori si sommano temporalmente e/o spazialmente generando l'effetto risultante sul neurone postsinaptico [3].

1.2 Il Cervello

Il **cervello**, o telencefalo, è formato dagli emisferi cerebrali destro e sinistro. Ogni emisfero comprende la **corteccia cerebrale**, costituita da una sostanza grigia di corpi cellulari, la sostanza bianca, composta da fibre mieliniche, e i nuclei sottocorticali [3].

1.2.1 La Corteccia Cerebrale

La **corteccia cerebrale** è molto sottile ma estremamente convoluta a formare giri e solchi che consentono di avere un'estesa superficie mantenendo limitato il volume

[2] Brevi depolarizzazioni della membrana neuronale
[3] Sostanze chimiche rilasciate da neuroni presinaptici nello spazio sinaptico e riconosciute attraverso recettori o canali ionici sulla membrana di neuroni postsinaptici.

occupato. Inoltre, la corteccia ha una struttura multistrato che permette un'efficiente integrazione tra i neuroni per l'elaborazione del segnale. Gli emisferi cerebrali si dividono in quattro lobi: **frontale**, **parietale**, **occipitale** e **temporale** (*Figura 3*).

Il lobo frontale è il più grande dei lobi del cervello, comprende oltre il 40 % della corteccia cerebrale. La porzione anteriore del lobo, detta lobo prefrontale, ospita aree legate alla capacità di prestare attenzione, di programmare il futuro e di controllare emozioni ed alcuni aspetti della personalità. Nel lobo frontale sinistro si trova l'area di Broca che consente l'elaborazione del linguaggio; lesioni e disfunzioni del lobo frontale possono provocare disturbi emotivi o perdita di autocontrollo. Il lobo temporale ha un ruolo importante nei processi mnemonici, nella percezione olfattiva e nel controllo delle emozioni. Inoltre, esso include l'area di Wernicke, coinvolta nella comprensione del linguaggio. Il lobo occipitale contiene i centri dell'area visiva primaria ed è implicato nel riconoscimento degli oggetti visualizzati. Il lobo parietale ospita l'area somestesica primaria che elabora stimoli tattili, termici, dolorifici e cinestetici; inoltre controlla la capacità di localizzare oggetti in movimento e di percepire la posizione delle varie parti del corpo [2] [3].

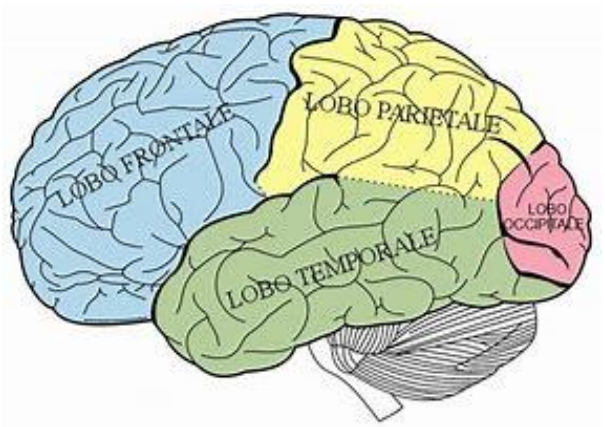


Figura 3: Lobi del cervello umano

1.2.2 Il Corpo Calloso

Il **corpo calloso** (CC) è la più estesa struttura connettiva del cervello umano, composta da più di 200 milioni di assoni che trasferiscono informazioni tra i due emisferi cerebrali; pertanto, ha un ruolo fondamentale nella comunicazione interemisferica. Sono state descritte anatomicamente quattro distinte regioni del CC che sono il rostro, il genu, il tronco e lo splenio. Si sostiene che il ruolo principale del CC sia quello di modulare le influenze eccitatorie e inibitorie provenienti dagli emisferi per ottenere una risposta bilanciata; il suo funzionamento resta comunque oggetto di numerosi studi, negli ultimi anni indirizzati a due particolari condizioni: la callosotomia e l'agenesia del CC [4] [5].

1.2.3 La callosotomia

La callosotomia o resezione chirurgica del CC è stata introdotta nel 1940 da van Wagenen e Herren come rimedio palliativo a crisi epilettiche intrattabili. Dagli anni '70, sono state esplorate e sviluppate tecniche alternative a questo intervento, una delle quali permette di risparmiare la parte posteriore dello splenio effettuando una callosotomia parziale anteriore. La procedura è stata progressivamente abbandonata a causa dei potenziali effetti collaterali, verificatisi più di frequente nella callosotomia totale, e grazie allo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche o chirurgiche meno invasive. Nonostante ciò, la callosotomia si è dimostrata in grado di trattare con successo un'ampia varietà di crisi e sindromi epilettiche. L'efficacia dell'intervento è dovuta al fatto che le scariche epilettiformi sono generalmente bilateralmente sincrone e la callosotomia riduce la sincronia, la frequenza e l'ampiezza delle scariche migliorando, di conseguenza, la vita del paziente. Oltre alle complicanze relative all'aspetto chirurgico i pazienti che subiscono callosotomia, detti pazienti split-brain, possono incorrere in diversi effetti avversi, prevalentemente rari e temporanei, come afasia,

disturbi del linguaggio e deficit di memoria. Una condizione generalmente temporanea, ma i quali sintomi possono essere permanenti, è la **sindrome da disconnessione**. In questa situazione, gli oggetti presentati esclusivamente all'emisfero non dominante per il linguaggio potrebbero non essere riferiti verbalmente dal paziente. Può, ad esempio, accadere che la mano non dominante non risponda più in modo affidabile ai comandi verbali, perché l'emisfero dominante non è in grado di trasferire prontamente le informazioni alla corteccia motoria non dominante. Altra manifestazione peculiare è la **sindrome della mano estranea** (AHS) per cui la mano non dominante di un paziente agisce senza essere apparentemente guidata dalla volontà del paziente stesso. I pazienti con AHS possono raggiungere gli oggetti con la mano non dominante e iniziare a manipolarli senza che il paziente lo desideri. La maggior parte dei pazienti non sono, infatti, consapevoli di questi deficit. [6]

Numerosi studi sui pazienti split-brain hanno permesso di avere una migliore comprensione dell'organizzazione del cervello umano, in particolare per ciò che concerne la dominanza cerebrale.

1.2.4 La dominanza cerebrale

L'emisfero cerebrale in cui la comprensione e la produzione del linguaggio è prevalentemente elaborata si definisce **dominante**. Nella maggior parte della popolazione, l'emisfero sinistro è dominante e si occupa anche del controllo della mano preferita e del linguaggio; l'emisfero destro, invece, controlla la comprensione e l'espressione delle emozioni. Poiché le differenze tra i due emisferi sono solitamente mascherate dall'integrazione che avviene attraverso il corpo calloso, i pazienti split-brain si sono rivelati una straordinaria opportunità di ricerca. Nella Figura 4 è illustrato

un tipico esperimento a cui il paziente viene sottoposto. Dopo aver mostrato le immagini di un oggetto, viene chiesto di identificarlo. Se l'immagine è presentata all'emisfero sinistro l'identificazione avviene correttamente, contrariamente, il soggetto non riesce a identificare verbalmente l'oggetto presentato all'emisfero destro. Questo accade perché l'informazione relativa all'oggetto nell'emisfero destro non ha accesso ai centri del linguaggio dell'emisfero sinistro. Il soggetto poteva, tuttavia, identificare l'oggetto riconoscendolo attraverso la sensibilità tattile della mano sinistra [1].

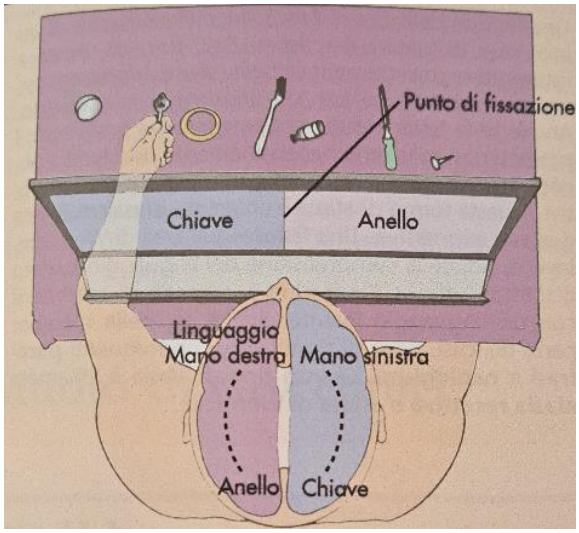


Figura 4: Tecnica utilizzata per lo studio della dominanza emisferica nei soggetti split-brain. Al soggetto viene chiesto di fissare il centro dello schermo, sul quale vengono proiettate le immagini. Se un'immagine viene proiettata nel campo visivo sinistro, produce una replica dell'immagine nell'emisfero destro e viceversa. Il soggetto può anche afferrare, ma non vedere degli oggetti posti al di là di uno schermo e riconoscerli attraverso il tatto. [1]

1.2.5 Agenesia del Corpo Calloso

L'**agenesia del CC** (AgCC) è una rara anomalia congenita nella quale si verifica un mancato sviluppo del CC o di una sua parte. L'AgCC si può manifestare durante l'infanzia, nel caso di sindrome grave, oppure in maniera più lieve nei giovani adulti. I sintomi più comuni sono convulsioni, idrocefalo ed alterazioni nello sviluppo mentale e fisico. Storicamente, la maggior parte della ricerca sui soggetti con AgCC si è concentrata sulle conseguenze dell'assenza del corpo calloso, con l'aspettativa che i pazienti con AgCC presentassero una "sindrome da disconnessione" simile a quella osservata nei pazienti sottoposti a callosotomia. Nel complesso, però, nei pazienti con AgCC si osservava un'integrazione interemisferica migliore, anche se limitata, rispetto ai pazienti split-brain. L'importanza relativa dell'età di insorgenza dell'AgCC rispetto alla callosotomia per il trasferimento interemisferico (IHT) è illustrata dalla constatazione che i pazienti con callosotomia precoce e i bambini con AgCC mostrano poche evidenze di una sindrome da disconnessione nei test IHT con semplici informazioni tattili, mentre i pazienti con callosotomia adolescenziale e adulta mostrano marcati deficit di trasferimento. Questo suggerisce che la plasticità neurale nei bambini possa consentire il rinforzo di percorsi neurali alternativi, come la commisura anteriore. L'esplorazione strutturale e funzionale di queste vie alternative è una frontiera critica nella ricerca sull'AgCC. Gli studi di connettività funzionale nei pazienti con AgCC potrebbero rivelare i mezzi con cui questi cervelli altamente atipici raggiungono una apparentemente "tipica" integrazione interemisferica [7].

Le basi biologiche dell'AgCC sono complesse, come dimostra l'elevato numero di sindromi congenite umane associate all'AgCC, ad esempio la schizofrenia e l'autismo; è uno dei difetti congeniti neurologici più complicati perché sono coinvolti numerosi

processi di sviluppo affinché si generi un corpo calloso completo. Infatti, lo sviluppo calloso può essere influenzato da difetti nella proliferazione e nella migrazione cellulare, nella crescita e nella guida degli assoni, nello sviluppo gliale e nel patterning della linea mediana [7].

1.3 Funzioni Superiori del Sistema Nervoso Centrale

Le **funzioni cerebrali superiori** sono funzioni complesse come la memoria, il linguaggio, il ragionamento, la percezione e la coscienza. Non si conoscono ancora del tutto i meccanismi cerebrali che regolano queste funzioni ma si pensa che emergano dall'integrazione di informazioni che provengono dalle strutture corticali e che tale integrazione venga svolta dalle aree associative. A partire dal 2000, molte ricerche hanno mostrato che nello svolgimento di azioni che coinvolgono le funzioni cerebrali superiori si osserva la presenza di una rete di aree associative attive; le funzioni più complesse potrebbero quindi derivare dalla coordinazione delle attività delle diverse aree associative [1].

2 La connettività interemisferica

La ricostruzione cellulare della struttura connettiva al fine di comprendere la ricca funzionalità cerebrale è ad oggi considerata due delle più grandi sfide delle neuroscienze. Un paradigma centrale nelle moderne neuroscienze è che l'organizzazione funzionale del cervello è caratterizzata da **segregazione** e **integrazione** delle informazioni, associate rispettivamente alle teorie del locazionismo e connessionismo. A partire dalla frenologia[4] di Gall, il locazionismo ha suscitato un grande interesse tra gli scienziati, persuasi che fosse possibile attribuire ciascuna funzione cerebrale ad una specifica area corticale. Nel 1808 un comitato di scienziati dichiarò la frenologia non scientifica e perciò non valida, decisione probabilmente influenzata da Napoleone Bonaparte dopo un esame poco lusinghiero del suo cranio da parte di Gall. Comunque, ben presto fu chiaro che la diretta attribuzione di una funzione specifica a un'area corticale è fuorviante, data la dipendenza dell'attività cerebrale dalle connessioni anatomiche tra regioni cerebrali distanti. Si sviluppò in seguito la teoria della **segregazione** per la quale un'area corticale è specializzata per alcuni aspetti percettivi o motori e questa specializzazione è anatomicamente segregata nella corteccia. L' infrastruttura corticale che supporta una singola funzione potrebbe, quindi, coinvolgere molte aree specializzate, la cui unione è mediata dall'**integrazione** funzionale tra loro. Il concetto di integrazione deriva dall'emergentismo, che postula che "il tutto è qualcosa di diverso dalle parti" e che "nessun sistema complesso può essere compreso se non attraverso un'attenta analisi; tuttavia, le interazioni dei componenti devono essere considerate tanto quanto le proprietà dei componenti isolati". In questo

[4] Dottrina medica elaborata da F.J. Gall secondo la quale tutte le funzioni psichiche avrebbero una ben definita localizzazione cerebrale, cui corrisponderebbero dei rilievi sulla teca cranica, che consentirebbero la determinazione della loro esistenza, del loro sviluppo, e conseguentemente dei caratteri psichici dell'individuo [41].

senso, la segregazione e l'integrazione sono entrambe essenziali e responsabili dell'espletamento della funzionalità cerebrale [8] [9].

L'analisi della connettività cerebrale si basa su tre forme di connettività diverse ma correlate: la **connettività strutturale** (**SC**), detta anche connettività anatomica, che forma il **connettoma** attraverso contatti sinaptici tra neuroni vicini o tracce di fibre che collegano pool di neuroni in regioni cerebrali spazialmente distanti, la **connettività funzionale** (**FC**), definita come la dipendenza temporale dei modelli di attivazione neuronale di regioni cerebrali anatomicamente separate e la **connettività effettiva** (**EC**), che descrive l'influenza che un sistema neuronale esercita su un altro riflettendo le interazioni causali tra le aree cerebrali attivate [8].

2.1 La connettività strutturale

Superando la necessità di dissezionare post-mortem il cervello, dall'inizio degli anni '70 hanno cominciato a svilupparsi tecniche meno invasive e sempre più evolute di tracciamento della **connettività strutturale** mediante il trasporto assonale fisiologico [10]. Nel 1985, una svolta è arrivata con la comparsa della risonanza magnetica pesata in diffusione (DWI). La DWI misura la diffusione delle molecole d'acqua lungo diverse direzioni sfruttando l'impermeabilità degli assoni che vincolano la diffusione dell'acqua alla loro direzione principale. Pertanto, la DWI valuta indirettamente la microstruttura della sostanza bianca e permette di ricostruire i fasci principali degli assoni. Studi anatomici condotti su cervelli umani viventi hanno permesso di perfezionare la descrizione di questi grandi fasci di fibre e di scoprire la grande variabilità interindividuale, oltre che supportare i modelli funzionali, beneficiari, per la prima volta, di connettomi dell'intero cervello.

Le misure locali (a livello di voxel[5]) delle proprietà di diffusione possono fornire una visione della microstruttura locale della materia bianca, mentre la trattografia in vivo può fornire informazioni sull'organizzazione della materia bianca a livello di sistema [11].

2.1.1 La microstruttura anatomica delle connessioni

Le misure delle proprietà di diffusione a livello voxel, come l'anisotropia frazionale (FA) o la diffusività media, sono modulate dalla microstruttura locale del tessuto. Diversi studi su modelli dimostrano che la FA aumenta con l'aumento della densità o con la diminuzione del diametro degli assoni e diminuisce con la riduzione del diametro dello strato mielinico. Queste caratteristiche del fascio di fibre della materia bianca determinano il funzionamento fisiologico del fascio stesso, influenzando proprietà quali il tempo di conduzione, il tempo refrattario, la probabilità di trasmissione o la sincronizzazione dei segnali in una rete cortico-corticale distribuita.

Nonostante le nuove conoscenze fondamentali che fornisce, la **DWI** presenta diverse limitazioni importanti. Il limite principale nasce dall'uso del modello con tensore di diffusione (diffusion tensor imaging, DTI), il quale semplifica eccessivamente il reale movimento dell'acqua all'interno del tessuto cerebrale poiché assume la linearità e omogeneità della diffusione trascurando la sua componente non-gaussiana. La conseguenza pratica di questa eccessiva semplicità del modello del tensore di diffusione è che gli indici DTI comuni, la diffusività media e la FA, non sono specifici di un particolare compartimento tissutale. Le caratteristiche della microstruttura, come le dimensioni delle cellule, la densità, la permeabilità e la distribuzione dell'orientamento,

[5] Volumetric picture element, cioè la controparte tridimensionale del pixel.

influiscono tutte sugli indici DTI e le variazioni degli indici sono impossibili da associare a cambiamenti più specifici delle caratteristiche microstrutturali.

Un secondo approccio tenta di superare le criticità del modello DTI ipotizzando che la geometria del tessuto influenzi la diffusività delle molecole d'acqua. Ad esempio, è ragionevole ipotizzare che la diffusione dell'acqua all'interno dell'assone sia limitata dalla membrana mielinica, mentre altrove sia solo ostacolata o libera. Questo è il fondamento del modello composito di diffusione ostacolata e ristretta (**CHARMED**). Nel modello CHARMED, la diffusione ristretta nello spazio intra-assonale è modellata come diffusione all'interno di cilindri impermeabili. Uno dei vantaggi di CHARMED è la possibilità di ricostruire la funzione di distribuzione tridimensionale dello spostamento per ciascuna delle componenti (ostacolata e ristretta). In questo modo, è possibile estrarre parametri fisicamente significativi per ciascuno dei componenti diffusivi; questi parametri includono la diffusività della matrice extra-assiale (diffusività della parte ostacolata), la densità assonale (la frazione di volume della parte ristretta) e la direzione della fibra (la funzione di densità di orientamento della parte ristretta). Studi successivi hanno tentato di espandere il modello CHARMED per includere la dispersione delle fibre e il loro diverso orientamento ma, al momento, non esiste un singolo modello in grado di catturare tutti i dettagli e la complessità dei vari compartimenti neurali. Inoltre, se confrontati con la DTI, i nuovi modelli sono di più lenta applicazione e soprattutto richiedono grandi potenze di calcolo seppur offrano importanti informazioni aggiuntive.

Nonostante le limitazioni, la misurazione delle proprietà assonali fornisce una descrizione microstrutturale fondamentale per la migliore caratterizzazione delle connessioni cerebrali e della connettività [11] [12].

2.1.2 La macrostruttura anatomica delle connessioni

Dal punto di vista neuroanatomico, la **trattografia** permette di stimare l'organizzazione dei principali percorsi di fibre nel cervello umano e di esplorare la variazione della forza e dell'organizzazione di questi percorsi tra gli individui e durante la crescita. Molte evidenze della trattografia, convalidate da dissezioni post-mortem, convergono verso modelli comuni dei gruppi di fibre cerebrali. Tuttavia, è necessaria una certa cautela, in quanto alcune limitazioni della trattografia possono trarre in inganno i neuroanatomisti inducendoli a riunire diversi segmenti di fasci in complessi unitari (Figura 5). Si delinea, così, il problema del kissing che unito a quello del fanning, caratterizzato, invece, da una sottostima del numero di fibre che raggiungono un'area ha ostacolato i progressi nella rappresentazione delle vie di proiezione e commissurali.

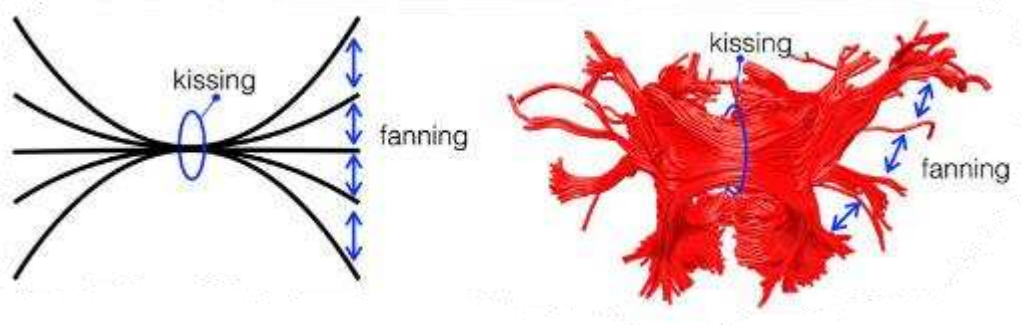


Figura 5: A sinistra un modello esemplificativo di kissing e fanning. A destra, un esempio di trattografia dello splenio del corpo calloso che evidenzia le stesse limitazioni

La trattografia non è equiparabile, in qualità, al tracciamento invasivo, ritenuto il "gold standard" e che prevede tipicamente l'iniezione di un tracciante in un'area di interesse, il suo assorbimento da parte delle cellule e l'osservazione in regioni interconnesse dopo che vi è stato trasportato attraverso meccanismi di trasporto eterogradi e/o retrogradi. Al contrario, nella trattografia in diffusione si seguono le stime del percorso di minor resistenza alla diffusione. In molti casi, questo corrisponde approssimativamente al

percorso dell'orientamento delle fibre dominanti, ma in altri casi non è così; si è quindi consapevoli che, come qualsiasi altro metodo in biologia, la trattografia di diffusione è suscettibile ai falsi negativi (l'incapacità di tracciare percorsi che sappiamo esistere) e ai falsi positivi (il tracciamento di percorsi spuri) [11].

Per poter comprendere il reale funzionamento della struttura cerebrale è necessario che la ricerca neurobiologica si basi su una struttura anatomica delle connessioni del cervello il più possibile dettagliata e completa (Figura 6). Lo scopo del **connettoma** umano è proprio quello di fornire un dataset unificato, tempo invariante e pronto all'uso di tutte le unità nervose e delle loro connessioni che sia standardizzato e accessibile a tutti. Ci si aspetta che i dati derivanti dalla registrazione dell'attività del cervello in combinazione con il modello strutturale fornito dal connettoma possa aiutare a discernere le interazioni causali nelle reti cerebrali su larga scala. Nondimeno, il connettoma potrebbe avere un grosso impatto nella nostra comprensione dei danni cerebrali, delle malattie neurodegenerative e di conseguenza delle terapie e strategie di prevenzione [13].

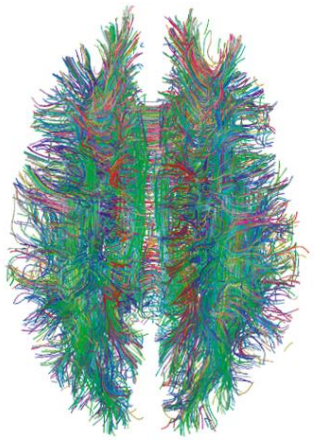


Figura 6: Ricostruzione trattografica delle connessioni neurali tramite MRI.

2.1.3 La neuroplasticità

La struttura anatomica delle connessioni è tutt'altro che fissa e immutabile. La **neuroplasticità**, ovvero la capacità di riorganizzazione funzionale e strutturale del cervello, può avvenire a diversi livelli (dai cambiamenti molecolari a quelli regionali) e su diverse scale temporali (da secondi ad anni). Studi pionieristici hanno, infatti, rivelato che nuove proiezioni di materia bianca possono formarsi in seguito a procedure di apprendimento estese. In particolare, il long-term potentiation (LTP) è uno dei meccanismi di neuroplasticità più studiati; associato al processo di apprendimento, memorizzazione e recupero della funzionalità dopo danneggiamento cerebrale, il LTP consiste nell'induzione di uno stato di eccitazione sinaptica persistente che modifica le spine dendritiche e i terminali sinaptici. Queste modificazioni hanno un impatto significativo sul rimodellamento delle reti cerebrali e sulla loro organizzazione [14]. Una volta che i meccanismi di plasticità della materia bianca potranno essere descritti con precisione, si potrebbe gettare una nuova luce sulla fisiologia cerebrale e fornire una definizione completamente nuova del concetto di connettività cerebrale [11].

2.2 La connettività funzionale

La **connettività funzionale** si definisce come dipendenza statistica tra eventi neurofisiologici anatomicamente distanti ma funzionalmente legati tra loro. La correlazione è dedotta sulla base di segnali di ossigenazione del sangue nella risonanza magnetica funzionale acquisiti durante lo svolgimento di un'attività o in stato di riposo.

Biswal e colleghi sono stati i primi a dimostrare che durante il riposo le regioni emisferiche destra e sinistra della rete motoria primaria non sono silenziose, ma mostrano un'elevata correlazione tra le loro serie temporali di risonanza magnetica

funzionale (fMRI), suggerendo un'elaborazione continua delle informazioni e una connettività funzionale tra queste regioni. In seguito, è stato dimostrato che il cervello consuma una quantità sorprendente di energia anche in stato di riposo. Il peso di un cervello umano adulto è solo il 2% del peso corporeo complessivo, ma l'energia consumata dal cervello è circa il 20% del consumo energetico totale. Inoltre, gli studi confermano che il cervello utilizza il 60-80% dell'energia per la comunicazione tra i neuroni e le loro cellule di supporto, detta attività intrinseca, mentre per le altre attività il cervello utilizza solo lo 0,5-1,0% dell'energia totale [8].

L'acquisizione nello stato di riposo prevede semplicemente la raccolta di dati di imaging funzionale dai partecipanti mentre fissano un mirino o con gli occhi chiusi, astenendosi dall'impegnarsi in qualsiasi compito cognitivo specifico. Una volta raccolti i dati, una forma di analisi per esaminare le connessioni funzionali di una particolare regione cerebrale è il metodo seed-based. Le analisi delle **Region of Interest seed-based** (ROI) correlano le serie temporali dello stato di riposo di una regione cerebrale di interesse a priori (ROI) rispetto alle serie temporali di tutte le altre regioni cerebrali, ottenendo una mappa di connettività funzionale; la mappa fornisce informazioni su quali regioni la ROI è collegata e in quale misura. Uno dei problemi dell'utilizzo di questo metodo è che non esistono regole o indicazioni comuni su come selezionare la regione d'interesse.

Altra tecnica spesso utilizzata è l'analisi delle componenti indipendenti (ICA), in cui si seleziona il numero di componenti desiderate e cerca l'esistenza di sorgenti spaziali di segnali nello stato di riposo che variano insieme nel tempo e sono massimamente distinguibili da altri insiemi di segnali. Un possibile svantaggio dell'ICA è la

rappresentazione complessa dei dati che può complicare la traduzione dei risultati ottenuti in risultati clinicamente rilevanti.

Nell'analisi della connettività funzionale nello stato di riposo sono risultate diverse criticità riguardanti gli artefatti da movimento e i rumori fisiologici. Infatti, nonostante l'attenzione rivolta dagli studiosi nell'escludere soggetti che si muovevano molto durante le acquisizioni, anche piccoli movimenti del soggetto provocavano grandi cambiamenti nei dati. Per questi motivi la ricerca si è concentrata nel migliorare le tecniche di rimozione degli artefatti da movimento e in quelle di preelaborazione dei dati.

2.2.1 La connettività strutturale condiziona la funzionalità

I primi modelli funzionali del cervello sono emersi dallo studio di pazienti con danni cerebrali, per i quali la localizzazione della lesione nel cervello veniva interpretata come l'origine principale della compromissione funzionale. Tuttavia, l'esistenza di pazienti con lesioni diverse e sintomi simili ha in un certo senso squalificato l'ipotesi della dipendenza unica del deficit funzionale dalla regione lesionata avallando invece l'idea che fosse implicato un meccanismo di disconnessione della sostanza bianca che comprometteva la comunicazione tra le diverse regioni. Con l'avvento dell'imaging cerebrale, la comunità delle neuroimmagini si è concentrata sui voxel in modo indipendente, senza alcun tentativo di cogliere l'influenza della struttura connettiva tra loro. L'accesso alla visualizzazione e alla mappatura delle connessioni della materia bianca ha permesso di indagare le connessioni della sostanza bianca nei pazienti e ha portato alla scoperta di nuove sindromi da disconnessione. Ad esempio, la negligenza visuo-spaziale, una grave condizione neurologica caratterizzata dalla perdita della

consapevolezza di metà del campo visivo, è associata all'interruzione delle fibre che collegano il lobo frontale a quello parietale.

La trattografia ha inoltre contribuito alla definizione di ipotesi di ipoconnettività nello sviluppo neurologico per la psicopatia, la dislessia e la prosopagnosia congenita. Viceversa, le ipotesi di aberrazione/aumento delle connessioni (cioè, di iperconnessione) sono state recentemente suggerite come potenziali meccanismi per la disattenzione nei disturbi da deficit di attenzione e iperattività, e per le allucinazioni uditive e visive nella schizofrenia. Tutti questi risultati dimostrano l'estrema importanza delle connessioni cerebrali per il corretto funzionamento del cervello. Infatti, le aree cerebrali private dei loro input (connessioni afferenti) o output (connessioni efferenti) non saranno più in grado di contribuire all'elaborazione della cognizione e del comportamento. Per quanto riguarda gli effetti sul comportamento, è stato dimostrato che le differenze individuali nelle prestazioni comportamentali per un determinato compito sono correlate con le variazioni nella microstruttura della materia bianca delle vie rilevanti per il compito, anche in popolazioni giovani e sane.

Questo suggerisce che la funzione di un'area cerebrale può essere definita dalle sue connessioni afferenti e dalle connessioni efferenti con altre aree, quindi, regioni cerebrali possono essere caratterizzate dalla loro connettività strutturale con il resto del cervello; in altre parole, i confini basati sulla connettività strutturale potrebbero fornire una suddivisione funzionale del cervello.

2.3 La connettività effettiva

L’integrazione funzionale in un sistema distribuito si può meglio comprendere considerando il concetto di **connettività effettiva** (EC), definita come l’influenza che un sistema neurale esercita su di un altro, sia a livello sinaptico che complessivo. Questa definizione è perentoria in quanto disambigua gli effetti di una risposta evocata da uno stimolo comune da quelli indotti dalle sole connessioni neurali tra due unità. All'inizio, la connettività effettiva si riferiva a modelli, nel senso di schemi circuitali quanto più semplici possibile in grado di spiegare le risposte osservate [14]. Nel linguaggio moderno, questi corrispondono ai modelli causali dinamici con la massima evidenza: cioè, modelli con la minima complessità che forniscono una spiegazione accurata dei dati rilevati. In sostanza, mentre la FC è un fenomeno osservabile e quantificabile attraverso metodi statistici come la correlazione e la covarianza, la EC corrisponde a parametri di un modello che si propone di spiegare le dipendenze statistiche trovate, ovvero la FC. Quindi gli studi sulla FC procedono dalle conseguenze fisiologiche, rilevate dall’analisi di immagini, alla distinzione delle cause o classificazione delle classi diagnostiche; all’opposto la EC confronta modelli generativi di accoppiamento tra stati cerebrali nascosti (le ipotizzate cause) che possano aver prodotto le manifestazioni neurofisiologiche (le conseguenze) [8].

Esistono, ad oggi, diversi metodi per stimare la connettività effettiva sulla base di modelli fenomenologici di serie temporali, come la causalità di Granger (GC), o di modelli neuronali realistici, come la modellazione causale dinamica (DCM).

L'idea alla base della GC è che, se una serie temporale A "causa" un'altra serie temporale B, allora le informazioni passate di A dovrebbero aiutare a prevedere B

meglio di quanto si possa fare solo con le informazioni storiche di B stessa. In altre parole, se l'inclusione delle osservazioni passate di A migliora la capacità di prevedere B rispetto a quando si considerano solo le osservazioni passate di B, si può affermare che A "causa" B secondo il concetto di Granger. La GC è basata su un'associazione statistica e non implica necessariamente una relazione di causa-effetto nel senso tradizionale. Inoltre, la causalità di Granger non può stabilire la direzione causale, cioè se A causa B o viceversa. Può solo determinare se una serie temporale è un fattore causale di un'altra.

Invece, l'idea di base del DCM è che l'attività neurale si propaghi attraverso le reti cerebrali come in un sistema input-state output, dove le interazioni causali sono mediate da dinamiche neuronali non osservabili (nascoste). Il processo di DCM inizia con la selezione di un modello basato su conoscenze anatomiche o ipotesi specifiche sulle connessioni neurali; successivamente il modello viene adattato ai dati osservati per stimare i parametri che descrivono le connessioni tra le diverse regioni cerebrali coinvolte. Infine, si valutano i modelli prodotti confrontandoli e determinando quale si adatta meglio ai dati sperimentali.

GC e DCM hanno quindi obiettivi e punti di forza complementari. Infatti, mentre la GC è una procedura inferenziale generica che caratterizza la connettività funzionale diretta, la DCM è un quadro di riferimento che consente di testare modelli o ipotesi specifiche. In altri termini, la GC modella la dipendenza tra le risposte osservate e la DCM modella l'accoppiamento tra gli stati nascosti che generano le osservazioni [15].

3 Materiali

3.1 Risonanza Magnetica Funzionale

Negli ultimi decenni si sono sviluppati molti metodi di mappatura dell'attività del cervello umano divisibili in due gruppi: quelli basati sulla localizzazione dell'attività elettrica e quelli che invece si concentrano sulle conseguenze fisiologiche e metaboliche dell'attività elettrica. Tra le tecniche non invasive del primo gruppo più utilizzate ci sono l'elettroencefalografia (EEG) e la magnetoencefalografia (MEG); queste consentono di ottenere un'ottima risoluzione temporale dei processi neurali ma non garantiscono una buona risoluzione spaziale. Invece la risonanza magnetica funzionale (fMRI), che appartiene al secondo gruppo, analizza aspetti metabolici come variazioni della perfusione sanguigna oppure dell'ossigenazione del sangue conseguenti all'attività cerebrale. In quest'ultimo caso la risonanza viene chiamata blood oxygenation level dependent (**BOLD**) **fMRI** e consente di ottenere risoluzioni spaziali dell'ordine di pochi millimetri e risoluzioni temporali di pochi secondi. Il funzionamento della fMRI è fondato sui principi della risonanza magnetica nucleare.

3.1.1 Principi fisici di Risonanza Magnetica

La **Risonanza Magnetica** (RM) si basa sul segnale generato da nuclei di idrogeno contenuti nelle cellule del corpo umano. Gli atomi di idrogeno sono costituiti da un singolo protone dotato di spin nucleare, cioè un momento angolare intrinseco dovuto alla rotazione intorno al proprio asse. Dal momento che il protone possiede una carica diversa da zero, il suo movimento genera anche un campo magnetico a cui è associato il momento magnetico μ. Il rapporto tra il momento magnetico e quello angolare di un nucleo è conosciuto come rapporto giromagnetico γ e differisce tra nuclei diversi; per l'atomo di idrogeno $\gamma = 42.58\ \mathrm{MHz/T}$.

In presenza di un campo magnetico esterno B_0 in direzione z, i protoni possono assumere una configurazione di stato a bassa energia o ad alta energia allineandosi rispettivamente in direzione parallela o antiparallela al campo B_0. In base all'intensità del campo magnetico esterno varierà la percentuale di nuclei orientati con lo stesso.

L'interazione con il campo magnetico genera un moto di precessione del momento magnetico μ intorno alla direzione di B_0 con una frequenza angolare, chiamata frequenza di Larmor o frequenza di risonanza, che dipende da B_0 e γ secondo l'equazione (3.1):

$$f_0 = \gamma * B_0 \quad (3.1)$$

Vengono a formarsi due coni di precessione che rappresentano i due stati parallelo e antiparallelo; la magnetizzazione M_0 del tessuto, causata dal campo magnetico esterno, è orientata nella stessa direzione del campo.

Eccitando il tessuto con un campo magnetico oscillante a radiofrequenze (RF) nella direzione x, quindi perpendicolarmente a B_0, risulta un moto del vettore M che viene definito **nutazione**. Inoltre, se l'impulso a RF è alla stessa frequenza di risonanza f_0 si verifica la transazione di alcuni nuclei da uno spin parallelo ad uno antiparallelo che modifica il valore del vettore M, creando una componente nel piano x-y.

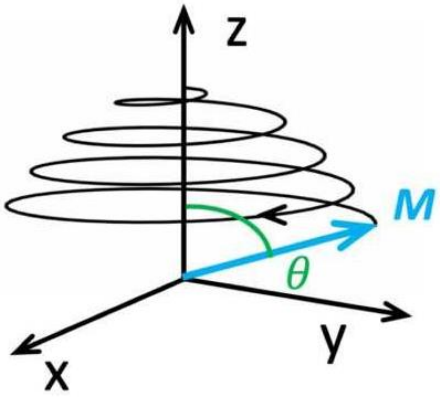


Figura 7: Traiettoria del vettore magnetizzazione nel ritorno allo stato di equilibrio

Cessato l'impulso a RF, la magnetizzazione ritorna allo stato di equilibrio (Figura *7*) e si definiscono due periodi di tempo detti tempi di rilassamento T1 e T2. Il rilassamento longitudinale **T1**, o rilassamento spin-reticolo, è il tempo necessario per il recupero della magnetizzazione assiale di equilibrio; in questo periodo i nuclei ritornano allo stato parallelo grazie al campo magnetico esterno B_0. T1 dipende dallo stato fisico del materiale; infatti, è minore nei liquidi dove la libertà di movimento degli atomi è maggiore rispetto ai solidi. L'equazione (2) descrive l'andamento del modulo della componente assiale del vettore M:

$$M_z(t) = M_0\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T1}\right)\right] \quad (3.2)$$

Il rilassamento trasversale **T2**, o rilassamento spin-spin, si riferisce alla componente x-y della magnetizzazione, il quale ritorno al valore di equilibrio dipende dalla velocità di precessione dei nuclei atomici; questa è a sua volta sensibile a forti campi magnetici che velocizzano il processo. Il campo magnetico tende a permanere più facilmente nei solidi rispetto ai liquidi per cui avremo un tempo T2 generalmente più breve nei solidi. I moduli delle componenti trasversali del vettore M variano secondo le leggi:

$$M_x(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T2}\right)\cos(\gamma B_0 t) \quad (3.3)$$

$$M_y(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T2}\right)\sin(\gamma B_0 t) \quad (3.4)$$

Il segnale generato dalla precessione del vettore M intorno all'asse z induce una variazione del flusso magnetico e quindi una tensione oscillante su una bobina di ricezione posta intorno al tessuto eccitato. Questo segnale rilevato è detto free induction decay (**FID**).

La costante di tempo T2 può essere influenzata anche da proprietà del campo magnetico come la sua inomogeneità ΔH o da gradienti di campo Gr aggiunti per la formazione delle immagini. Risultano le seguenti equazioni

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{\gamma \Delta H}{2} \quad (3.5)$$

$$\frac{1}{T2^{**}} = \frac{1}{T2^*} + \gamma Gr \quad (3.6)$$

In generale le disomogeneità e i gradienti del campo contribuiscono a determinare un decadimento trasversale più rapido, si può infatti scrivere:

$$T2^{**} \leq T2^* \leq T2 \leq T1 \quad (3.7)$$

3.1.2 Formazione delle immagini di Risonanza Magnetica

Il processo di formazione delle immagini nella RM è costituito da tre fasi:

a) **Selezione della sezione di interesse (o slice)**: attraverso l'applicazione di un gradiente di campo magnetico lungo la direzione di B_0, si induce una variazione lineare della frequenza di Larmor degli atomi, dividendo il tessuto in piani isofrequenziali paralleli. Ne consegue che un impulso RF ad una determinata frequenza ecciterà soltanto uno dei piani, o sezione di interesse.

b) **Codifica in fase**: dopo l'impulso a RF e prima dell'acquisizione del segnale si applica un gradiente lungo una direzione della sezione di interesse. Il processo viene poi ripetuto variando in ampiezza o durata il gradiente e quindi la fase degli spin eccitati.

c) **Codifica in frequenza**: durante l'acquisizione del segnale si applica un altro gradiente nella seconda direzione spaziale della sezione determinando una variazione della frequenza di emissione dei protoni. Nel segnale risultante dai tre processi sono distinguibili le singole magnetizzazioni, con le proprie fasi e frequenze, dipendenti dalla posizione spaziale.

Nella Figura *8* è rappresentata una sequenza tipica di imaging con trasformata di Fourier. Questa sequenza di eventi rispetta l'ordine del processo sopra descritto per cui l'impulso RF e il gradiente Gs, applicati contemporaneamente, consentono la selezione della slice di interesse; successivamente i gradienti Gϕ e Gf, rispettivamente per la codifica di fase e di frequenza, vengono attivati. La sequenza viene ripetuta per diverse volte, solitamente 128 o 256, per l'ottenimento dell'immagine. Il tempo che intercorre

tra le ripetizioni è chiamato **tempo di ripetizione** (TR). Si registra, infine, il segnale FID risultante.

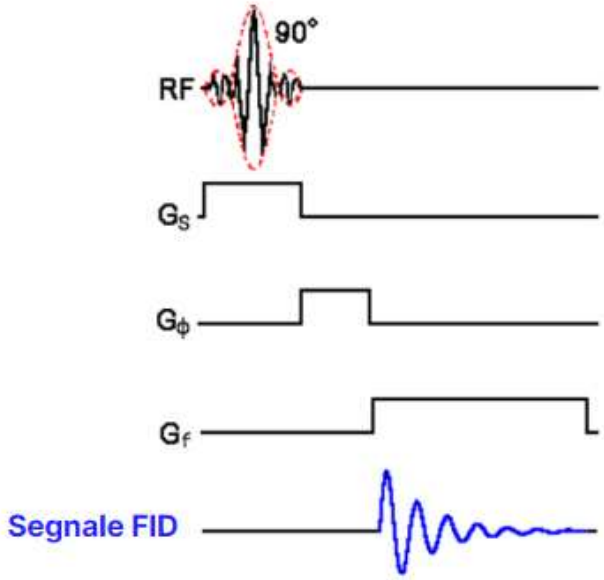


Figura 8: Sequenza di formazione dell'immagine

A questo punto il segnale FID deve essere processato in modo da estrarre la frequenza e la fase di ogni singolo spin. Il metodo più utilizzato è la trasformata di Fourier bidimensionale (2DFT), una trasformata di Fourier applicata ad una matrice di dati bidimensionale.

L'eccitazione dei nuclei attraverso i segnali RF e i gradienti di campo magnetico può essere controllata in modo da generare diverse sequenze di eccitazione. La classica sequenza con stimolo a 90° è detta sequenza 90-FID. La sequenza spin-echo consiste nell'applicazione di un impulso a 90° e poi dopo un certo periodo di tempo di un impulso a 180°; questa eccitazione genera un segnale FID seguito da un segnale echo. Il tempo che intercorre tra l'impulso iniziale e la massima ampiezza del segnale echo è detto **tempo di echo** (TE). Nella sequenza inversion recovery il primo impulso a RF è a

180° e dopo un **tempo di inversione** (TI) viene applicato un secondo impulso a RF, questa volta a 90°.In entrambe le sequenze descritte, dopo il primo impulso a RF, occorre aspettare il ritorno all'equilibrio della magnetizzazione assiale prima di ripetere la sequenza risultando in una procedura troppo lunga, specie in caso di T1 elevati. Per questo viene soventemente applicata la sequenza gradient-echo (GE) che consente il rifasamento degli spin, tramite l'applicazione di un gradiente di rifasamento, rendendo molto più veloce la procedura.

L'effettiva formazione delle immagini dipende dall'intensità del segnale risultante nelle zone analizzate, in particolare dalla differenza di intensità del segnale tra la struttura di interesse e quelle adiacenti, detta anche **contrasto**. Le immagini per le quali il contrasto è determinato principalmente dalla differenza dei tempi T1 nei tessuti sono chiamate T1-pesate; allo stesso modo si definiscono le immagini T2-pesate e ρ-pesate, dove ρ è la densità protonica del tessuto. Anche la scelta dei parametri strumentali come TE, TR e TI è determinante per la creazione dell'immagine finale (Figura 9) [16].

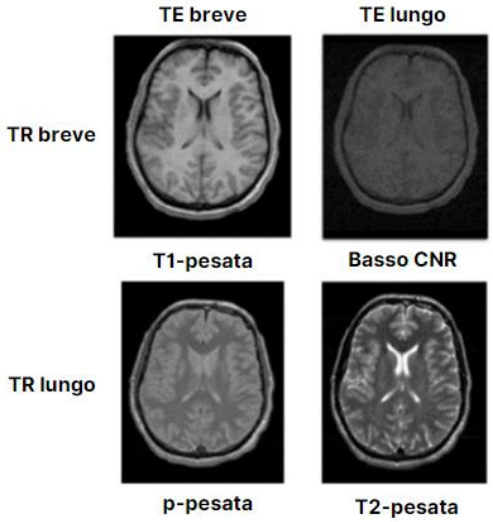


Figura 9: La scelta di TE e TR determina il contrasto dell'immagine. Si osserva che la combinazione di un TE lungo e un TR corto produce un basso control-to-noise ratio [17].

3.1.3 Fisiologia del segnale BOLD

La perfusione sanguigna gioca un ruolo fondamentale nel funzionamento del sistema nervoso in quanto trasporta sostanze essenziali per il metabolismo cerebrale. Quando una regione del cervello è attivata da un compito cognitivo si verifica un aumento dell'attività di trasmissione sinaptica che consuma energia e O_2 e restituisce prodotti di scarto come CO_2, NO. Il flusso sanguigno aumenta al fine di ripristinare i livelli di O_2 e glucosio. Inizialmente si verifica un accumulo di emoglobina deossigenata (Hb), subito seguito da un aumento dell'emoglobina ossigenata (HbO_2). Questa sequenza di processi viene chiamata risposta emodinamica all'evento neurale (HR). L'HbO_2 è diamagnetica e magneticamente indistinguibile dal tessuto cerebrale mentre l' Hb è altamente paramagnetica; questo paramagnetismo determina gradienti locali di campo magnetico, la cui forza dipende dalla concentrazione della molecola. Nel contesto della risonanza magnetica, questi gradienti endogeni provocano a loro volta una variazione dei tempi di rilassamento T2 e T2*. Utilizzando un campo magnetico esterno dai 1,5 T o 3 T il contrasto T2* è predominante rispetto al T2 [18].

3.1.4 Configurazioni sperimentali

Un tipico esperimento di fMRI, chiamato task based fMRI o **tb-fMRI**, prevede di utilizzare stimoli visivi, uditivi o di altro tipo per indurre alternativamente due o più stati cognitivi diversi nel soggetto per poi raccogliere e analizzare i segnali prodotti dai singoli voxel. In questa situazione uno stato è chiamato condizione sperimentale mentre l'altro, condizione di controllo; l'obiettivo è quello di verificare l'ipotesi che i segnali prodotti differiscano tra i due stati. I tb-fMRI si fondano sull'assunzione che un processo cognitivo si aggiunga semplicemente agli altri processi cerebrali in esecuzione senza provocare una variazione degli stessi (principio dell'*inserzione pura*); in realtà in

molte situazioni si verifica una complessa interazione, intrinsecamente non lineare, tra i processi cognitivi [19].

Negli ultimi decenni si è affermata una tipologia di fMRI molto più vantaggiosa per innumerevoli aspetti, chiamata **resting state fMRI** (rs-fMRI). Un primo vantaggio è che non necessita di ulteriore strumentazione, come per esempio dispositivi per stimolazione uditiva e/o visiva, oltre lo scanner MR; inoltre, l'acquisizione è molto semplice e non richiede una particolare esperienza dell'operatore che la esegue. Al paziente non è richiesto di svolgere attività cognitive; ciò rende la rs-fMRI accessibile ad una più larga fetta della popolazione che potrebbe non essere in grado di svolgere specifici task [20].

3.1.5 Resting State Networks

La rs-fMRI si rivela di fondamentale importanza nello studio di quelle che vengono chiamate **Resting State Networks** (RSNs). Una RSN è un gruppo di regioni cerebrali che mostrano somiglianze nei segnali BOLD registrati in stato di riposo. La network più conosciuta è la Default Mode Network (DMN) che contiene regioni la cui attività decresce sensibilmente durante lo svolgimento di un qualsiasi tipo di azione rispetto allo stato di riposo; la DMN comprende la corteccia cingolata posteriore, il precuneo, la corteccia prefrontale mediale, il lobulo parietale inferiore e la corteccia temporale laterale. Altre importanti RSNs sono la dorsal attention network (DAN), le visual networks, le auditory networks e le sensorimotor networks osservabili in Figura 10.

Occorre segnalare che questa categorizzazione del cervello deriva da una scelta arbitraria di un determinato livello di granularità; è possibile individuare sottosistemi all'interno delle singole network delineando un'organizzazione gerarchica. Inoltre,

alcune regioni potrebbero appartenere a più RSNs e in maniera diversa per partecipazione [21].

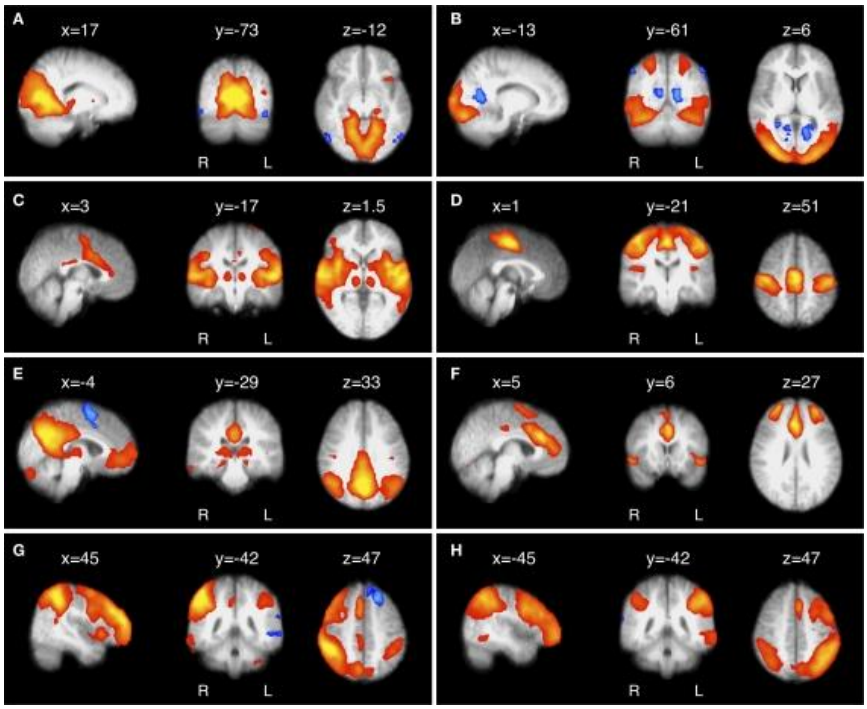


Figura 10: Otto delle RSNs più comuni. (A) Corteccia visiva primaria; (B) Corteccia visiva extrastriata; (C) Corteccia uditiva e altre cortecce di associazione sensoriale; (D) Corteccia somatomotoria; (E) DMN; (F) Rete implicata nel controllo esecutivo; (G, H) Reti fronto-parietali, lateralizzate a destra e a sinistra, implicate nei processi cognitivi attentivi [22].

3.2 Acquisizione dei dati

La maggior parte delle fMRI sfrutta un sistema di imaging planare a eco (EPI). I parametri strumentali da definire da parte dell'operatore sono il tempo di ripetizione TR, la dimensione dei voxel e la copertura. Il TR controlla la risoluzione temporale, la dimensione dei voxel determina la risoluzione spaziale mentre la copertura indica la parte del cervello analizzata. Per la copertura si sceglie, tipicamente, di analizzare tutto il volume cerebrale e si deve necessariamente trovare un compromesso tra la risoluzione

temporale e quella spaziale in quanto ridurre la dimensione del voxel implica un aumento del tempo TR.

Utilizzando un registratore Multiband EPI si possono acquisire simultaneamente più segnali grazie alla presenza di diverse bobine di ricezione. Il grande vantaggio risiede nella sensibile riduzione del tempo TR ma potrebbero verificarsi con più frequenza artefatti da movimento e minor contrasto tra materia bianca e grigia.

In una tipica acquisizione si registra il segnale dopo un tempo di echo TE variabile in base al tipo di tessuto. È inoltre possibile, però, acquisire più volte il segnale ad un tempo inferiore a TE ottenendo due o più immagini per TR (multi-echo); questo consente di estrarre meglio il segnale di interesse dal rumore di base [20].

3.2.1 Sorgenti di rumori nei dati

I rumori che affliggono i dati nella rs-fMRI vengono classificati in rumori dovuti alla strumentazione e rumori fisiologici o di movimento. Nei primi ricadono le interferenze elettromagnetiche, errori di drift (variazione nel tempo della baseline del segnale BOLD), distorsioni e drop out (perdita di segnale in alcune aree), solitamente evitabili in fase di acquisizione. I secondi rimangono, invece, più problematici perché non possono essere totalmente rimossi. Tra i rumori fisiologici, il movimento della testa del paziente potrebbe produrre un disallineamento tra i volumi oppure indurre variazioni nei campi magnetici e nel movimento dei nuclei quindi del segnale BOLD. Altri fenomeni

fisiologici come la respirazione e il battito cardiaco, oltre a concorrere nella produzione di movimenti del capo, generano aliasing[6] [20].

3.2.2 Database Reale

Il database studiato è costituito da immagini funzionali ed anatomiche di un soggetto sano e di un soggetto che ha subito callosotomia. I dati sono stati acquisiti precedentemente tramite risonanza magnetica, con intensità di campo magnetico pari a 1.5 T, sequenza di eccitazione EPI, tempo di ripetizione 3 s, tempo di echo 0.05 s ed ordine di acquisizione delle slice bottom-up. In Figura 11 si possono osservare le immagini anatomica e funzionale tipiche di una slice acquisita nel soggetto sano.

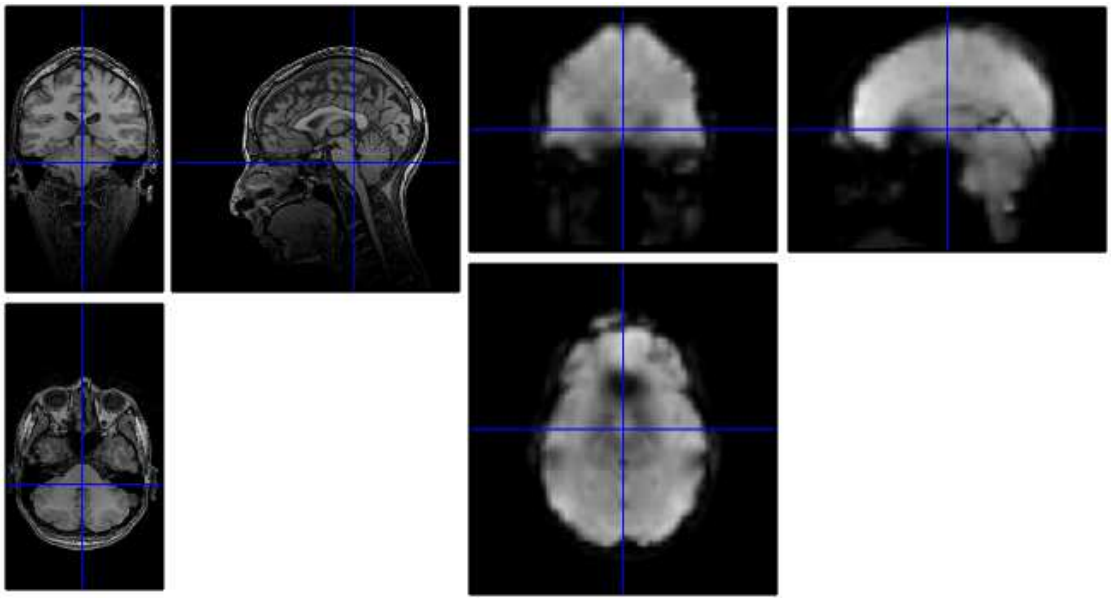


Figura 11: Immagini anatomiche (a sinistra) e funzionali (a destra) delle sezioni frontale, sagittale e trasversale del cervello.

[6] Distorsione del segnale causato da sottocampionamento del segnale originario. Il risultato è che il segnale non può essere correttamente ricostruito.

4 Metodi

4.1 Preprocessing

Dopo l'acquisizione il primo stadio di elaborazione dei dati è il preprocessing. L'obiettivo del preprocessing è quello di ridurre i disturbi provocati da artefatti e in generale disturbi strutturati che potrebbero essere presenti nei dati. Questo step è fondamentale soprattutto per l'analisi della connettività funzionale poiché la similarità tra i segnali BOLD di regioni cerebrali differenti potrebbe talvolta essere indotta da alcune tipologie di rumori come la respirazione o il movimento degli arti. Al momento non esistono procedure gold-standard di preprocessing, cioè sempre adatte ed affidabili, e per questo spesso si verificano problemi di riproducibilità dei risultati ottenuti negli studi su rs-fMRI.

4.1.1 Fasi principali del preprocessing

Il primo step di preprocessing è la **correzione del movimento** attraverso la scelta di un volume di riferimento, idealmente quello con la minore quantità di artefatti, e la successiva registrazione spaziale di ogni volume rispetto al riferimento. In sostanza ogni volume viene adattato, mediante una serie di trasformazioni, in modo da coincidere spazialmente col riferimento e ottenere volumi allineati tra loro. Inoltre, vengono stimati e registrati sei parametri, chiamati motion parameters, che descrivono il movimento del capo; tre di essi si riferiscono alle traslazioni (nelle direzioni x, y e z) e tre alle rotazioni (rollio, beccheggio e imbardata) [20].

Il secondo step è detto **slice timing correction** e consente di correggere differenze temporali di acquisizione delle fette quando il tempo di ripetizione è piuttosto elevato (intorno ai 3 secondi). Il metodo utilizzato è l'interpolazione nel tempo del segnale in

modo da traslare le serie temporali dei voxel in base al ritardo di acquisizione. Lo slice time correction non viene applicato quando il TR è molto basso come nel caso di multiband EPI [23].

Il prossimo step è lo **spatial smoothing** o spatial filtering che consiste nel calcolo, per ogni voxel, di una media pesata del segnale proveniente dai voxel vicini. Il risultato è un'immagine più sfocata ma anche un aumento del rapporto segnale/rumore o signal to noise ratio (SNR). Il livello di smoothing può essere variato in base alle esigenze ma spesso si adotta il full-wide-half-maximum (FWHM) del Kernel gaussiano scelto per il calcolo della media pesata. La scelta della grandezza del Kernel è importante in quanto può variare le reti funzionali rilevate e i parametri nelle analisi ICA e PCA [24].

In seguito, si può applicare un'operazione di filtraggio con un filtro temporale passa-alto per rimuovere le componenti di disturbo ed estrarre il segnale di interesse. Scegliendo la frequenza di taglio opportuna si può modulare il livello di filtraggio in base alla qualità di risoluzione del dataset a disposizione (minore la qualità e maggiore la frequenza di taglio).

Se si vuole eseguire un'analisi su un gruppo di pazienti è necessario considerare la variabilità interpersonale delle dimensioni e forme del cervello e adattare i dati in modo che ogni voxel di ciascun paziente corrisponda alla stessa regione del cervello; in altre parole, registrare i pazienti in uno spazio standard. Lo spazio standard è un sistema di coordinate comune usato per descrivere regioni del cervello (alcuni di questi sono gli spazi MNI, EPI e T1). La **registrazione** opera, quindi, delle trasformazioni alle immagini per normalizzarle ad un template di coordinate e dimensioni standard. Questo permette confronti di gruppo tra i risultati di analisi su singoli pazienti ottenuti in uno

spazio funzionale e viceversa di analizzare l'attivazione di una regione dello spazio standard per un singolo soggetto [20].

Essendo la rs-fMRI molto sensibile ai rumori strutturali, occorre aggiungere agli step convenzionali appena descritti altri metodi basati sulla regressione lineare multipla.

4.1.2 Regressione lineare multipla e General Linear Model

La regressione lineare multipla ha lo scopo di creare un modello in grado di descrivere i segnali osservati nei dati raccolti. Si basa su **regressori**, variabili indipendenti che descrivono alternativamente la varianza dei dati di interesse o di quelli che si vogliono rimuovere e **variabili dipendenti**, spesso costituite dal segnale BOLD di un singolo paziente. L'analisi cerca di trovare la migliore combinazione lineare di regressori che produce una serie temporale simile ai dati osservati; essa restituisce, quindi, un coefficiente β per ogni regressore, determinato dall'influenza che lo stesso ha sulla combinazione lineare finale. Il General Linear Model (GLM) è comunemente utilizzato in neuroimaging per la sua grande versatilità sia in analisi tra gruppi di soggetti che per rimuovere rumore nei dati. Il GLM più semplice e intuitivo si basa su un singolo regressore; altri più complessi contengono più regressori e sono descritti dalla seguente equazione (4.1):

$$Y = X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \cdots + X_N\beta_N + \varepsilon \quad (4.1)$$

dove Y è il dato, $X_1, X_2, \ldots, X_N$ i regressori, $\beta_1, \beta_2, \ldots, \beta_N$ i coefficienti e ε l'errore residuo. Il risultato di un modello di questo tipo applicato ad un dataset rs-fMRI è un'insieme di mappe di coefficienti $\beta_1, \beta_2, \ldots, \beta_N$ per ogni voxel, come illustrato in Figura 12 [20]. L'**errore residuo**, chiamato anche residui nelle analisi multiple, è

calcolato per sottrazione e rappresenta sostanzialmente la variabilità che non può essere spiegata dai regressori del modello. Sul calcolo dei residui si basano molte strategie di riduzione del rumore strutturato come la nuisance regression.

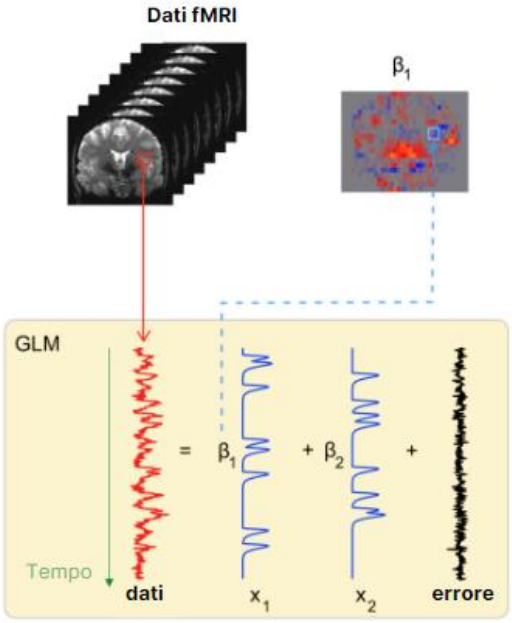


Figura 12: Mappa dei coefficienti β risultanti dall'applicazione del modello GLM [20]

4.1.3 Nuisance regression

La **nuisance regression** è un metodo di riduzione del rumore basato sul modello GLM che consiste nell'individuare un gruppo di regressori e calcolare rispetto ad essi i residui del segnale. Sono scelti come regressori i motion parameters estratti durante la fase di correzione del movimento oppure le serie temporali associate alla sostanza bianca o al fluido cefalorachidiano. Il vantaggio di questo processo è l'assenza di ulteriori dati da acquisire e la semplicità e velocità di applicazione. D'altro canto, alcuni rumori non sono eliminabili con un modello lineare perché molto complessi e naturalmente non lineari; inoltre, i regressori potrebbero essere correlati alla stessa connettività funzionale

limitando, di conseguenza, l'efficacia del metodo [25]. Per rimuovere definitivamente, per quanto possibile, il rumore si ricorre ad un'analisi delle componenti indipendenti o ICA approccio molto più flessibile e vantaggioso.

4.2 Indipendent Component Analysis

L'**analisi delle componenti indipendenti (ICA)** è un potente strumento per la separazione delle sorgenti dei segnali fMRI che consente di decomporre i dati raccolti in componenti di due tipologie: artefatti e non-artefatti (associati ad un segnale di attività neuronale). In questo modo è possibile estrarre il segnale dal rumore semplicemente selezionando le componenti di interesse ed eliminando le rimanenti. L'ICA viene applicato dopo l'acquisizione, il preprocessing e la scelta, manuale o automatica, del numero delle componenti indipendenti da estrarre.

Il problema del mescolamento di segnali provenienti da diverse sorgenti è presente in molti aspetti della vita quotidiana. Uno dei classici esempi proposti per spiegare la situazione è il problema del cocktail party in cui alcune persone si trovano nella stessa stanza e parlano tra di loro; si vuole ascoltare la voce di un solo individuo tra tutte le altre e fortunatamente l'uomo, grazie all'udito binaurale, ha la capacità di localizzare la sorgente sonora di interesse ed estrarla dal rumore concentrandosi su di essa. Una situazione simile è la presenza di sfocatura in un'immagine che viene scattata mentre il fotografo muove la fotocamera; in questo caso, la ricostruzione dell'immagine parte dall'individuazione della traiettoria del movimento della camera. Il termine Blind Source Separation (BSS) viene usato nell'ambiente dell'elaborazione dei segnali per descrivere un problema di sovrapposizione di segnali in genere lineare, come nelle due situazioni descritte, ma talvolta anche non lineare. Il metodo ICA è ideale nel caso in cui

i segnali siano linearmente combinati e per la sua applicazione devono essere rispettate le seguenti condizioni:

a) I vettori sorgente sono statisticamente indipendenti;
b) La matrice A, come definita in seguito, è quadrata e di rango massimo;
c) La matrice S, come definita in seguito, non contiene rumori esterni;
d) I dati sono centrati (la loro media è nulla);
e) I segnali devono essere non-gaussiani.

Considerando un vettore colonna di dimensione m tale che $x(m) = [x_1, x_2, \dots, x_m]^T$, contenente i dati osservati come serie temporali per ogni voxel e il vettore sorgente di dimensione n (n≤ m) tale che $s(n) = [s_1, s_2, \dots, s_n]$ si ha

$$x(m) = As(n) \quad (4.2)$$

Dove A è una matrice m x n invertibile, detta **mixing matrix**, che combina le componenti del vettore **s,** contenente i segnali derivanti dalle sorgenti indipendenti. A questo punto si costruisce la matrice W, o **unmixing matrix**, tale che

$$y(m) = Wx(m) = WAs(n) \quad (4.3)$$

Questo approccio è chiamato *cieco* perché non si conoscono né la mixing matrix A né la matrice sorgente s(n). L'obiettivo di ICA è quindi quello di scoprire ed estrarre segnali sorgente nascosti dai dati osservati che sono combinazioni lineari sconosciute di sorgenti non osservate. Per ottenere la decomposizione sono necessari momenti statistici di ordine superiore, come asimmetria e curtosi, che possono essere stimati esplicitamente nella procedura di unmixing oppure attraverso funzioni non lineari.

Esistono diversi algoritmi per estrarre le componenti indipendenti della matrice s(n) come FastICA e Infomax basati rispettivamente sulla massimizzazione della non-gaussianità e sulla minimizzazione dell'informazione mutuale tra le sorgenti [26].

La spatial-ICA consente una decomposizione in componenti spazialmente indipendenti allineandosi al principio della localizzazione delle attività neurali in aree specifiche del cervello; come spiegato nel paragrafo 2, questa assunzione potrebbe ignorare il principio dell'integrazione indebolendo il modello che rimane, però, ad oggi uno strumento fondamentale nell'analisi fMRI. In Figura 13 si può notare che i dati osservati in quattro dimensioni vengono arrangiati in una matrice bidimensionale inserendo i voxel in una singola riga per ogni istante di tempo. Questa matrice viene poi scomposta in due matrici, la prima contenente le serie temporali nelle colonne e la seconda la mappa spaziale delle componenti per ogni riga [27].

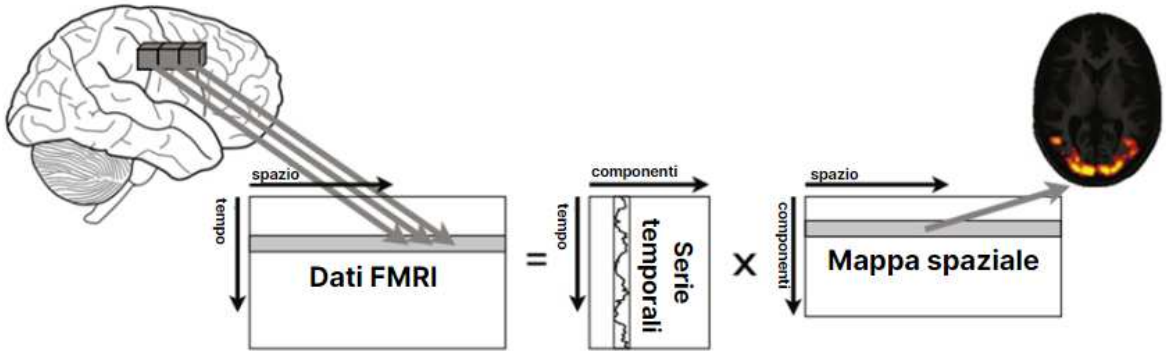


Figura 13: Rappresentazione schematica della spatial ICA [27].

Una volta che le componenti indipendenti sono state estratte, esse devono essere classificate in modo da individuare quali di esse possono essere considerate rumore e

quali segnale di interesse. Questa procedura può essere svolta manualmente o attraverso metodi automatici o semiautomatici di classificazione.

4.2.1 Classificazione manuale delle componenti indipendenti

Seppure la classificazione manuale possa risultare laboriosa e richiedere una certa esperienza, è spesso necessaria e più affidabile rispetto a metodi completamente automatici. L'analisi manuale richiede di esaminare **tre aspetti fondamentali**: le mappe spaziali, le serie temporali e lo spettro di frequenze delle serie temporali. Le prime dovrebbero idealmente contenere pochi grandi cluster (non piccoli e sparsi) e i picchi di attivazione dovrebbero registrarsi in corrispondenza alle regioni di materia grigia; si possono quindi classificare come rumore le mappe che presentano cluster sulla sostanza bianca o sul fluido cefalorachidiano. Per le serie temporali si verifica che siano pressoché stabili e non presentino picchi o variazioni del pattern di oscillazione. Infine, lo spettro delle frequenze dovrebbe mostrare un segnale predominante alle basse frequenze (tra 0.01 e 0.1 Hz) [28].

4.2.2 Classificazione automatica delle componenti indipendenti

Sono stati sviluppati molti metodi di classificazione ICA automatici basati sui più svariati approcci. Il metodo **FMRIB's ICA-based X-noiseifier (FIX)** è noto per il suo utilizzo nello Human Connectome Project[7]; esso estrae un gruppo di 180 caratteristiche (features) riguardanti i tre aspetti fondamentali dalle componenti ICA; sulla base di queste, FIX assegna un punteggio ad ogni componente che descrive la probabilità che la stessa sia segnale di interesse (e non rumore). Individuando una soglia di punteggio si

[7] Progetto volto alla realizzazione di una mappa delle reti cerebrali, o connettoma, per lo studio della connettività anatomica e funzionale del cervello in condizioni di salute o di patologie neurologiche.

esegue la classificazione. FIX può essere applicato solo dopo una classificazione manuale di una parte dei dati che vanno a costituire il "training set" sul quale l'algoritmo si allena e apprende come eseguire la classificazione.

Altro metodo di comune applicazione è l'**ICA-AROMA**, che supera la necessità una classificazione manuale preparatoria ed utilizza soltanto quattro features rispetto alle 180 di FIX, diminuendo il costo computazionale. ICA-AROMA è, però, indirizzata soprattutto ai rumori legati al movimento, quindi, potrebbe non eliminare componenti affette da rumori di diverso tipo. In generale si adotta FIX in studi con larghi database e ICA-AROMA in studi più ristretti [20].

In conclusione, i metodi basati su ICA per la rimozione del rumore si rivelano adatti in molte situazioni ma vanno considerate le possibili limitazioni. Primo tra tutti il fatto che l'efficienza della classificazione è dipendente dalla qualità dei dati, cioè dalla loro risoluzione spaziale e temporale. Inoltre, si presenta una certa soggettività nella scelta delle soglie di classificazione, perciò, è consigliabile, laddove possibile, controllare manualmente i risultati ottenuti dai metodi automatici.

4.3 Analisi della connettività funzionale

4.3.1 Analisi voxel-based

I metodi voxel-based stimano la connettività funzionale per ogni voxel consentendo di ottenere una mappa del cervello contenente un valore per ogni voxel che rispecchia la sua attivazione. Tra le voxel-based si annoverano le analisi di correlazione seed-based (SCA) e ICA.

Nelle **SCA**, anche chiamate analisi ROI-based, si individuano delle regioni di interesse (ROI) costituite da un singolo voxel o gruppi di voxel per poi misurare la correlazione tra le serie temporali della ROI e delle altre parti del cervello. Il primo passaggio è la selezione della ROI che può avvenire mediante l'uso di atlanti del cervello o approcci basati sui dati osservati; questi ultimi sono preferibili perché consentono di definire più accuratamente i confini funzionali della regione. Successivamente si estraggono le serie temporali BOLD dalle ROI eseguendo alternativamente una media del segnale su tutti i voxel inclusi nella ROI (esponendosi al rischio di avere voxel con segnale rumoroso) oppure una dual regression, sostanzialmente una media pesata in cui i voxel che contribuiscono meno alla ROI assumono un peso inferiore. Nel caso di dataset particolarmente non rumorosi l'adozione di uno o l'altro metodo non provoca differenze significative. Infine, si realizza la mappa di connettività attribuendo un coefficiente ad ogni voxel in base alla correlazione tra le sue serie temporali e quelle della ROI. Questo tipo di analisi è detta **hypothesis-driven** poiché investiga la connettività di una particolare regione scelta in partenza; ciò implica che non sia possibile rilevare eventuali segnali secondari che potrebbero presentarsi e aggiungersi a quello registrato. Si ha quindi una semplificazione eccessiva delle dinamiche del segnale neuronale che comunemente comprende svariati e complessi pattern di attivazione simultanei. Inoltre, i risultati sono molto suscettibili alla scelta della ROI tantoché si potrebbero ottenere risultati molto diversi variando leggermente la sua posizione spaziale. L'analisi ROI-based è sicuramente consigliata per esplorare l'attivazione di sistemi particolarmente complessi ma non per trarre conclusioni in analisi esplorative [20] [29].

Contrariamente al metodo ROI-based, l'analisi con ICA è un approccio multivariato, cioè, considera i dati estratti da tutti i voxel nello stesso momento, e totalmente

esplorativo. Può, ad esempio, essere utilizzato per estrarre le RSNs (paragrafo 3.1.5) da un database.

4.3.2 Analisi probabilistica delle componenti indipendenti

Nell'uso di ICA si possono verificare problemi di overfitting nel caso in cui siano estratte troppe componenti, spesso per descrivere segnali molto rumorosi. Per prevenire l'overfitting si può optare per un'**analisi probabilistica delle componenti indipendenti** (o **Probabilistic ICA**) in cui all'equazione classica di ICA viene aggiunta una componente di rumore; questo rende il modello simile al GLM (paragrafo 4.1.2), con la differenza che il numero di regressori non è predefinito ma stimato dal modello. Rimane il problema della scelta del numero di componenti da usare (**dimensionalità**) per il quale selezionare un numero troppo basso di componenti (underestimation) può portare a scartare informazioni importanti sul segnale mentre all'opposto includere troppe componenti peggiora il processo interpretativo e aumenta il costo di calcolo [30]. La questione non è di facile risoluzione perché non è chiaro se esista un numero adatto di componenti o un criterio ottimale di scelta delle stesse; infatti, ICA è in grado di fornire decomposizioni valide per diverse dimensionalità. Si ritiene che la causa risieda nell'inabilità di interpretare correttamente le decomposizioni di alto ordine alla luce di una accurata comprensione della complessità biologica del sistema e dei segnali cerebrali [27].

4.4 Software SPM

Il software **SPM** (Statistical Parametric Mapping) è un pacchetto di software per l'analisi di dati fMRI sviluppato per l'utilizzo in ambiente Matlab. La mappatura parametrica statistica è il metodo voxel-based più usato per caratterizzare l'anatomia e i

cambiamenti funzionali legati alle malattie del sistema nervoso. SPM sfrutta l'inferenza per descrivere la risposta specifica di regioni cerebrali a fattori sperimentali e genera mappe contenenti i valori dei voxel che, in caso di ipotesi nulla, sono distribuiti secondo una funzione densità di probabilità nota (spesso t-Student o f-Student); le escursioni anomale di valori indicano effetti specifici attribuibili a processi cognitivi o sensorimotori.

SPM rappresenta un approccio univariato che, sebbene semplice, permette di non subire le problematiche riscontrate nei metodi multivariati come l'impossibilità di inferire su effetti specifici a livello regionale e la necessità di utilizzare molti parametri e iperparametri che in generale rendono il processo di stima meno efficiente [31].

4.4.1 Il toolbox CONN

CONN è un toolbox multipiattaforma basato su Matlab per il calcolo, la visualizzazione e l'analisi della connettività funzionale nella fMRI. Può essere usato insieme a SPM ed è di facile utilizzo grazie alla sua interfaccia grafica user-friendly. Il funzionamento di CONN è suddiviso in tre fasi sequenziali: setup, denoising e analisi di primo livello [32].

4.4.2 Setup

La fase di setup permette di definire le **informazioni di base** dell'esperimento, inserire le immagini da analizzare ed eseguire fasi di **preelaborazione** funzionale e anatomica come riallineamento, correzione slice-time, coregistrazione, normalizzazione, segmentazione, identificazione degli outlier e smoothing. Durante il caricamento delle immagini strutturali e funzionali è possibile esaminarle per verificare che non

presentino artefatti o irregolarità, come il ringing di Gibbs, una deformazione dell'immagine in presenza di regioni adiacenti di intensità di segnale molto differenti. Prima della preelaborazione viene richiesto di specificare l'ordine di acquisizione delle fette, il kernel di smoothing e la soglia di identificazione degli outlier; quest'ultima procedura riconosce potenziali outlier in base al segnale BOLD globale osservato e il movimento del soggetto nello scanner. Inoltre, sono automaticamente generate cinque tipologie di ROI: materia grigia, sostanza bianca, liquido cefalorachidiano (LCF), **atlante** e **network**; le prime tre derivano dallo step di segmentazione, l'atlante è una suddivisione della materia grigia del cervello e cervelletto secondo gli atlanti di Harvard-Oxford e AAL e le network contengono gruppi di nodi, o ROI, assegnati ad una singola rete, come ad esempio la DMN. Le ROI costituenti le network sono state precedentemente definite da un'analisi ICA di CONN su un dataset di 497 pazienti sani. Infine, si definiscono le tre **covariate di primo livello**: motion parameters, serie temporali qc, che rappresentano lo spostamento framewise del soggetto nello scanner e le variazioni del segnale BOLD globale e scrubbing, cioè le acquisizioni riconosciute come outlier; esse derivano dagli step di riallineamento e identificazione degli outlier e rappresentano il segnale di disturbo da eliminare [33].

Nell'implementazione pratica vengono eseguiti i seguenti step:

1) Definizione del numero di soggetti, numero di sessioni, tempo di ripetizione e tipo di acquisizione (Continuous, per il resting-state o Sparse, per il task-based) (Figura 15);

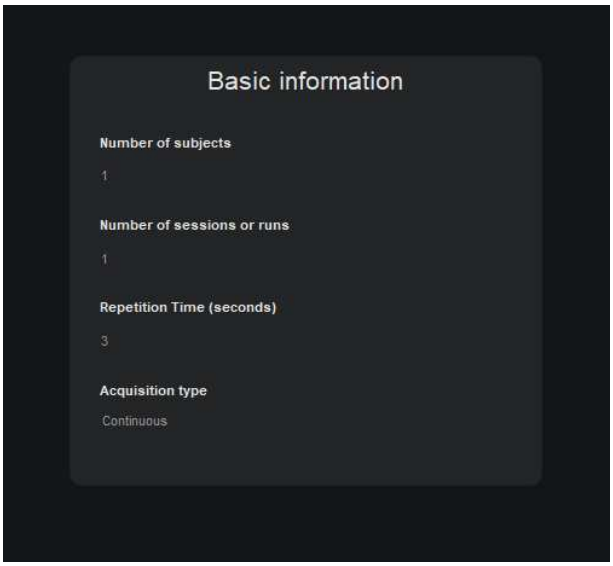


Figura 14: Interfaccia CONN per la definizione dei parametri iniziali.

2) Inserimento delle immagini anatomiche e funzionali grezze (Figura 15);

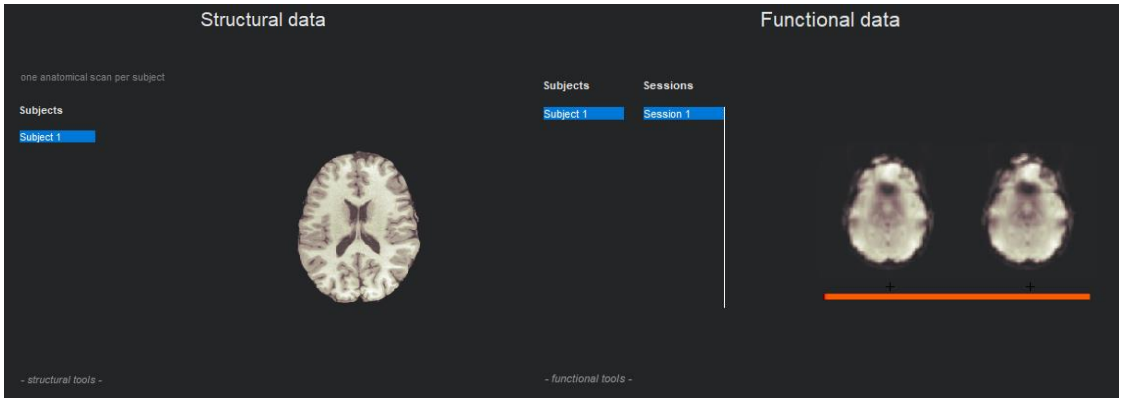


Figura 15: Interfaccia per l'inserimento delle immagini anatomiche, a sinistra e funzionali, a destra. Sono riprodotte la prima e l'ultima slice delle immagini funzionali acquisite in modo tale che si possano notare eventuali artefatti o movimenti importanti tra l'inizio e la fine dell'acquisizione.

3) Scelta della pipeline di preelaborazione (l'opzione di default include per le immagini funzionali: riallineamento, traslazione coordinate al centro (0,0,0), correzione slice-timing, identificazione outlier, segmentazione e normalizzazione in coordinate MNI, smoothing; per le immagini anatomiche: traslazione coordinate al centro (0,0,0), segmentazione e normalizzazione in coordinate MNI (Figura 16);

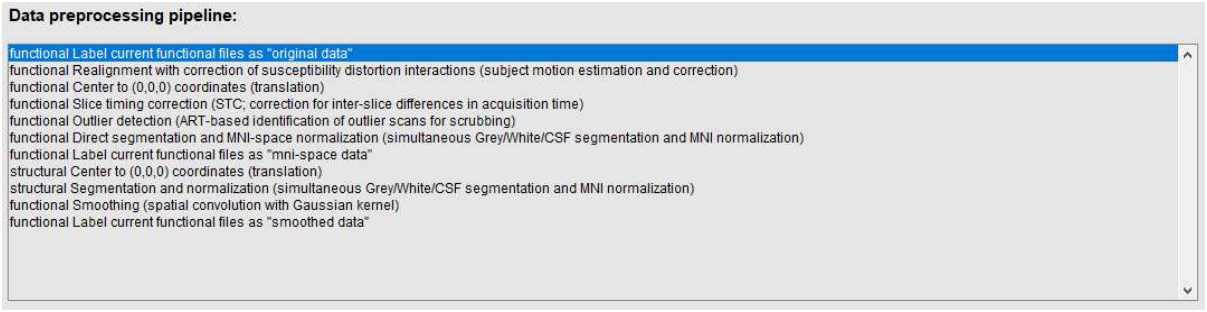


Figura 16: Step inclusi nella pipeline del preprocessing di default.

4) Selezione dell'ordine di acquisizione delle slice (nel caso in esame ascending, cioè sequenziale dal basso verso l'alto) (Figura 17);

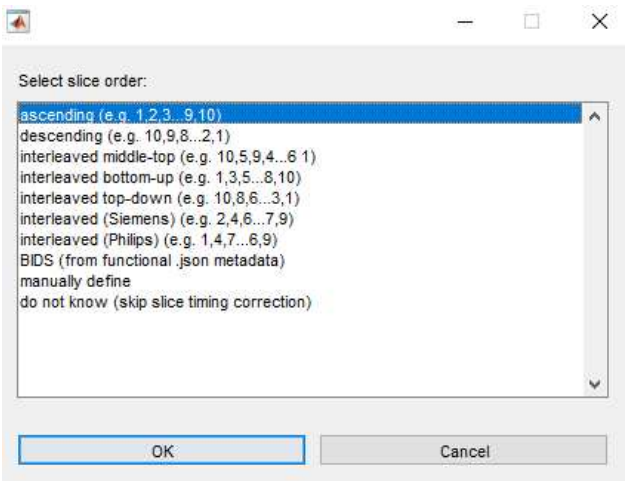


Figura 17: Interfaccia per la selezione dell'ordine di acquisizione delle slice.

5) Scelta della soglia di identificazione degli outlier (di default il 97 percentile) (Figura 18);

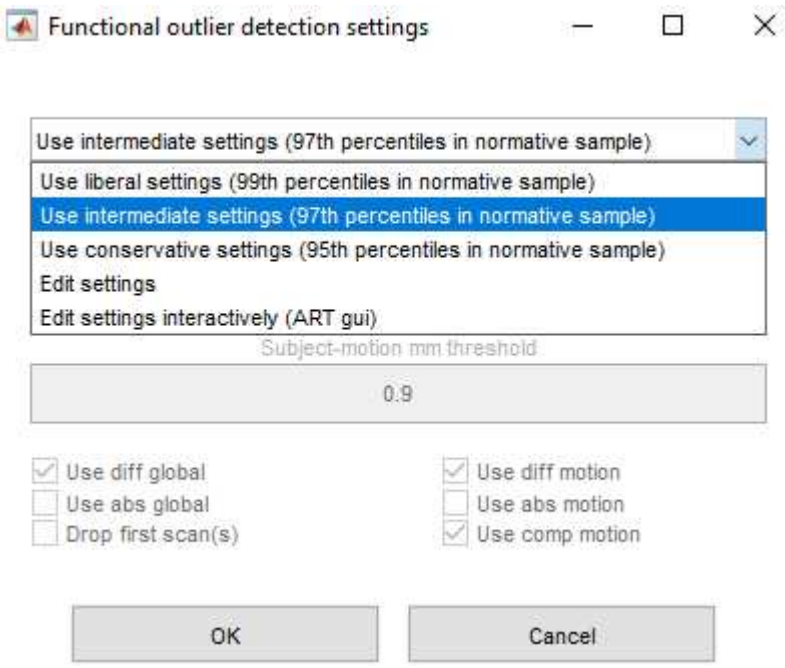


Figura 18: Interfaccia per la scelta della soglia di identificazione degli outlier. La soglia consigliata è il 97 percentile, ma si può adottare una soglia più restrittiva, 95 percentile, o più rilassata, 99 percentile.

6) Scelta delle opzioni di segmentazione e normalizzazione (ad esempio lo spazio di normalizzazione MNI) (Figura 19);

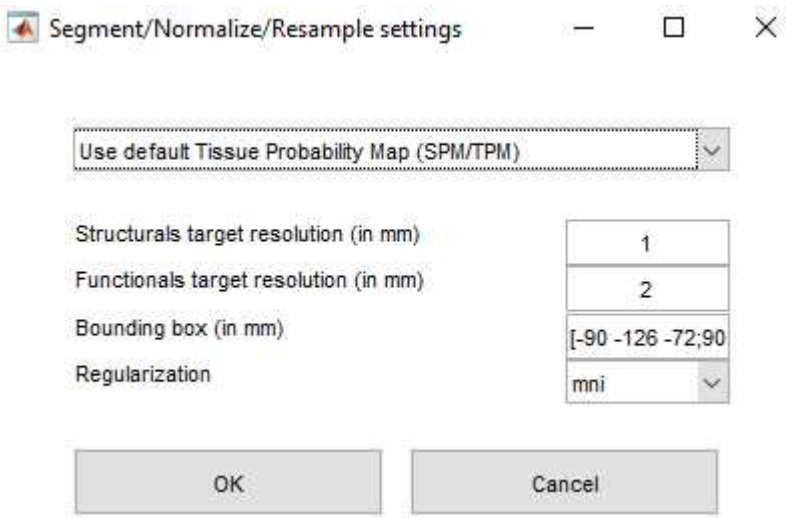


Figura 19: Inferaccia per la scelta delle opzioni di segmentazione, normalizzazione e ricampionamento. Se si vuole diminuire la risoluzione di campionamento delle immagini strutturali e funzionali, ad esempio per occupare meno memoria sul disco, si può aumentare il valore nei campi corrispondenti.

7) Selezione della dimensione in mm del kernel di smoothing FWHM (5 mm per i soggetti studiati);

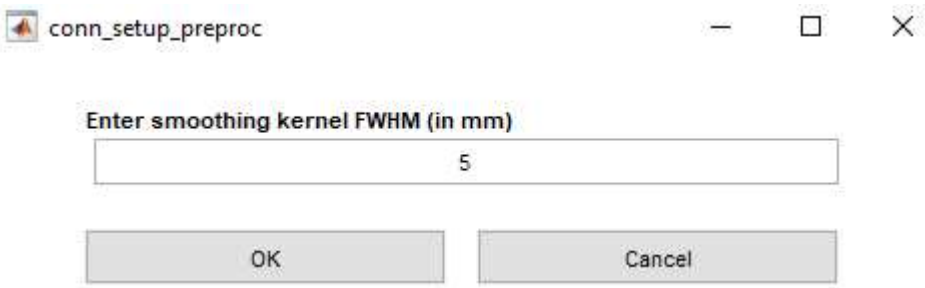


Figura 20: Interfaccia per la selezione della dimensione del Kernel di smoothing.

4.4.3 Denoising

Il denoising consente di definire, esplorare e rimuovere le possibili interferenze nel segnale BOLD, compreso il movimento fisiologico e altre fonti di rumore. La pipeline di default implementata da CONN consiste in una **regressione lineare** seguita da un **filtro temporale passa-banda**. La regressione con metodo dei minimi quadrati rimuove separatamente per ogni voxel i fattori identificati come potenziali effetti di confondimento per il segnale BOLD. I quattro fattori considerati sono le componenti di rumore dalla **sostanza bianca** e **LCF**, **dodici parametri di movimento** del soggetto (motion parameters e rispettive derivate prime), le scansioni anomale o **outlier** e gli **effetti lineari di sessione**.

Il successivo filtraggio temporale rimuove dal segnale BOLD le frequenze temporali inferiori a 0,008 Hz o superiori a 0,09 Hz per concentrare l'attenzione sulle fluttuazioni a bassa frequenza, minimizzando l'influenza del rumore fisiologico, del movimento della testa e di altre fonti di rumore; si esegue dopo la regressione per evitare qualsiasi disallineamento delle frequenze che possa accadere nella procedura di regressione del disturbo.

Al fine di verificare la buona riuscita del denoising viene effettuata una **stima della distribuzione dei valori di connettività funzionale** tra coppie di punti selezionati casualmente all'interno del cervello prima e dopo il denoising. Mentre prima del denoising le distribuzioni sono asimmetriche con vari gradi di bias positivi, coerenti con l'influenza di effetti fisiologici globali o su larga scala effetti fisiologici e di movimento del soggetto, dopo il denoising le distribuzioni si presentano approssimativamente centrate, con piccole code ma sensibilmente più grandi nel lato positivo. Infine, un

diagramma a tappeto scompone ogni volume da un cubo tridimensionale di voxel in un diagramma bidimensionale di quadrati dal quale si può osservare come il denoising attenui le transizioni più brusche tra i voxel, causate dal movimento, dalla deriva dello scanner e dal rumore fisiologico [33].

4.4.4 Analisi di primo livello

Le principali analisi della connettività in CONN sono misure basate sui semi, dall'inglese **seed-based-connectivity** (**SBC**) o **ROI-based-connectivity** (**RBC**), le quali mirano a studiare le proprietà di connettività funzionale a partire da regioni di interesse, dette anche semi, definite a priori [33]. Se si vuole studiare nello specifico una o poche singole regioni e analizzare in dettaglio i modelli di connettività tra queste e il resto del cervello sono molto utili le mappe di connettività SBC, o semplicemente **mappe SBC**. Le **mappe SBC** rappresentano il livello di connettività funzionale tra un seme/ROI e ogni voxel o posizione nel cervello; esse sono calcolate come coefficienti di correlazione bivariata Fisher-trasformati tra le serie temporali BOLD di una ROI e le serie temporali BOLD di ogni singolo voxel:

$$\boldsymbol{r(x)} = \frac{\int \boldsymbol{S(x,t)R(t)dt}}{(\int \boldsymbol{R^2(t)dt} \int \boldsymbol{S^2(x,t)dt})^{\frac{1}{2}}} \qquad (4.4)$$

$$\boldsymbol{Z(x)} = \boldsymbol{\tan^{-1}(r(x))} \qquad (4.5)$$

dove **S** è la serie temporale BOLD in ogni voxel (per semplicità tutte le serie temporali sono considerate centrate a media zero), **R** è la media delle serie temporali BOLD all'interno di una ROI, **r** è la mappa spaziale dei coefficienti di correlazione di Pearson e **Z** è la mappa SBC dei coefficienti di correlazione Fisher-trasformati per questa ROI.

Per studiare modelli di connettività tra più regioni o intere reti cerebrali si fa spesso uso di **metriche ROI-to-ROI** (RRC) le quali caratterizzano la connettività tra coppie di ROI di un insieme predefinito di ROI. Il risultato prodotto è una **matrice RRC** in cui ogni elemento è definito come il coefficiente di correlazione bivariata Fisher-trasformato tra una coppia di serie temporali BOLD di ROI:

$$\boldsymbol{r(i,j)} = \frac{\int \boldsymbol{R_i(t)R_j(t)dt}}{\left(\int \boldsymbol{R_i^2(t)dt} \int \boldsymbol{R_j^2(t)dt}\right)^{\frac{1}{2}}} \qquad (4.6)$$

$$\boldsymbol{Z(i,j)} = \mathbf{tan^{-1}}\boldsymbol{(r(i,j))} \qquad (4.7)$$

dove **R** è la serie temporale BOLD all'interno di ogni ROI, **r** è una matrice di coefficienti di correlazione e **Z** è la matrice simmetrica RRC di coefficienti di correlazione Fisher-trasformati.

CONN permette di generare anche **matrici RRC multivariate** (mRRC) in cui ogni elemento è definito come il coefficiente di correlazione semiparziale tra ogni coppia di ROI di un insieme predefinito di ROI, valutando l'influenza di tutte le altre ROI dello stesso insieme:

$$\boldsymbol{R_j(t)} = \sum_{\boldsymbol{i \neq j}} \boldsymbol{\beta(i,j)R_i(t)} + \boldsymbol{\epsilon_j(t)} \qquad (4.8)$$

$$\boldsymbol{\beta(i,j)} | \min_{\boldsymbol{\beta(i,j)}} \int \boldsymbol{\epsilon_j^2(t)dt} \qquad (4.9)$$

$$\boldsymbol{Z(i,j)} = \mathbf{tanh^{-1}}\left(\boldsymbol{\beta(i,j)c^{\frac{1}{2}}}\right) \qquad (4.10)$$

$$\boldsymbol{c} = \frac{\int \widetilde{\boldsymbol{R_i}}^{\boldsymbol{2}}(\boldsymbol{t})\boldsymbol{dt}}{\int \boldsymbol{R_j^2}(\boldsymbol{t})\boldsymbol{dt}} \quad (4.11)$$

dove **R** è la media delle serie temporali BOLD all'interno di ogni ROI tra un insieme predefinito di ROI, **β** è la matrice dei coefficienti di regressione multivariata, stimati soluzione con metodo dei minimi quadrati, e **Z** è la matrice mRRC di correlazione semiparziale Fisher-trasformata tra ogni coppia di ROI [33] [34].

Nell'esecuzione dell'analisi vanno dunque specificate le opzioni di connettività funzionale tra le seguenti:

1) *Seed-to-voxel,* se si vogliono ottenere mappe SBC;

2) *ROI-to-ROI,* per la generazione di matrici RRC;

3) *correlation*, per calcolare i coefficienti di correlazione Fisher-trasformata;

4) *bivariate*, in caso di correlazione bivariata;

5) semipartial, in caso di correlazione semiparziale.

4.4.5 Confronto analisi ROI-to-ROI tra soggetto sano e paziente split-brain

Per poter ottenere una migliore visualizzazione delle differenze tra soggetto sano e paziente split-brain le matrici RRC sono state poste a confronto. I valori dei coefficienti di correlazione delle matrici variavano in intervalli differenti; perciò, è stata effettuata una **normalizzazione** dei coefficienti al fine di avere un range di valori compresi tra 0 e 1; di seguito la formula applicata:

$$Z_{norm} = \frac{Z - \min\left(Z(:)\right)}{\max\big(Z(:)\big) - \min\left(Z(:)\right)} \quad (4.12)$$

Successivamente, ognuno dei valori ottenuti per ciascuna ROI del paziente sono stati sottratti ai rispettivi valori estratti dal soggetto sano in modo da determinare una matrice, detta **matrice differenza (Zdiff)**, contenente la differenza tra i valori di connettività funzionale di coppie di ROI tra soggetto sano e paziente. Infine, attraverso un codice Matlab, si può stampare a schermo la matrice Zdiff codificata cromaticamente. Il comando *imagesc()* codifica i dati di una matrice, inserita come input, in un'immagine che usa tutto il range di colori specificato dalla funzione *colormap()*; quest'ultima permette di scegliere mappe di colore predefinite, nel caso in esame è stata scelta quella denominata "jet" per avere aderenza alle matrici RRC generate da CONN; infatti questa opzione permette di avere un range di colori dal rosso, per il valore massimo, al blu, per il valore minimo. Le funzioni *xticks()* e *yticks()* sono state usate per definire le posizioni sull'asse x e y delle etichette delle ROI selezionate, mentre *xticklabels()* e *yticklabels()*, inseriscono le etichette delle ROI in corrispondenza delle suddette posizioni. Per ultimo, la funzione *colorbar()* stampa a schermo la barra di colore permettendo di visualizzare la codifica cromatica e il range valoriale.

4.4.6 Analisi della connettività effettiva con Spectral Dynamic Causal Modelling

Un passo ulteriore nello studio della connettività cerebrale risiede nell'uso del Dynamic Causal Modelling (DCM) che stima la connettività effettiva tra popolazioni accoppiate di neuroni. Lo Spectral DCM (spDCM) si serve di un modello power-law neuronalmente plausibile della dinamica accoppiata delle popolazioni neuronali per generare complessi spettri incrociati tra le risposte misurate. L' spDCM modella l'attività endogena che avrebbe prodotto la connettività funzionale osservata nella fMRI allo stato di riposo tra i nodi, sostituendo le serie temporali originali con le loro

statistiche del secondo ordine, i cross-spectra, sotto l'ipotesi di stazionarietà. Invece di stimare gli stati nascosti che variano nel tempo, si stima la loro covarianza, che non varia nel tempo [35].

Il manuale di SPM12 permette di eseguire un'analisi della connettività effettiva con spectral DCM per immagini di resting state fMRI. Il dataset è costituito da un soggetto prelevato dal dataset completo disponibile sul sito web del progetto FC10002, usato per analizzare l'integrazione delle informazioni nella DMN. Le regioni della rete sono state chiamate MPFC, PCC, LIPC e RIPC, per i lobi parietali destro e sinistro. Le immagini funzionali disponibili erano già **preelaborate**, cioè, avevano subito riallineamento, correzione slice-timing e normalizzazione spaziale, mentre l'immagine strutturale era normalizzata spazialmente. Sei motion parameters concludono il dataset [35].

Per prima cosa, è stata impostata l'**analisi GLM**, generando il file SPM.mat, per estrarre le serie temporali di interesse. Successivamente, si estrae il segnale dal liquido cefalorachidiano (LCR) e dalla sostanza bianca da utilizzare poi come **regressori di disturbo;** per fare ciò si definiscono i volumi di interesse (VOI), delle ROI sferiche, fissando un centro, di coordinate predefinite e ricavate dallo studio di riferimento (da uno dei ventricoli per il LCR e dal ponte per la sostanza bianca), e un raggio di 6 mm. Infine, il GLM può essere stimato includendo tra i regressori le serie temporali estratte dalla sostanza bianca, dal liquido cefalo rachidiano e dai sei motion parameters.

A questo punto si possono definire le regioni di interesse della DMN. Specificando un raggio di 8 mm per i VOI ed il centro degli stessi (sempre a partire dalle coordinate dello studio di riferimento), SPM calcola la serie temporale e la sua prima componente principale da tutti i voxel inclusi nelle sfere. I risultati vengono memorizzati in file

denominati *VOI_"nome della VOI"_1.mat*per tutte le quattro regioni della DMN: MPFC, PCC, LIPC, RIPC.

Premendo il pulsante "Dynamic Causal Modelling", specificando le VOI costruite, il tempo di echo e la **matrice di connettività** (A) si può costruire il DCM finale. La matrice A, in Figura 21, consente di costruire modelli diversi di connessione da una VOI ad un'altra e viceversa e rappresenta la connettività in assenza di input esterni. In questo caso siamo interessati a studiare un modello completamente connesso, cioè, a studiare ogni connessione da e verso ogni VOI. In ultimo, le varie metriche prodotte dal modello sono visualizzabili selezionando l'opzione "review". L'unità di misura della forza della connettività effettiva è l'hertz (Hz) perché rappresenta una frequenza di variazione della risposta neurale a causa di un'attività neurale.

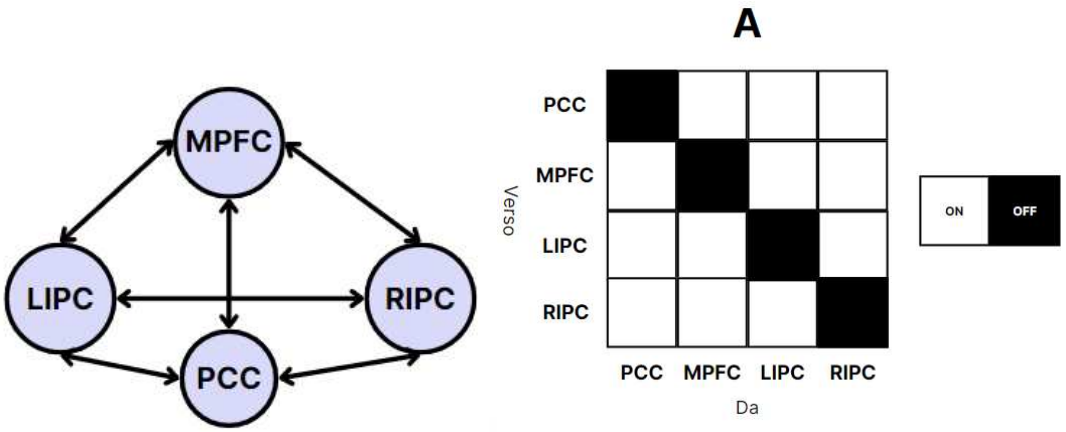


Figura 21: A sinistra un modello schematico completamente connesso dei collegamenti diretti tra le regioni della DMN [36]. A destra, la matrice A implementata nel DCM che rappresenta le connessioni estrinseche tra le regioni in forma matriciale (riadattata da [37]).

5 Risultati

5.1 Risultati dell'analisi guidata su un database open source

Al fine di acquisire familiarità con il toolbox è stata eseguita un'analisi guidata di dati prelevati da "*Yana Panikratova and Alexander Tomyshev and Ekaterina Pechenkova and Roza Vlasova (2020). fMRI: resting state and arithmetic task. OpenNeuro. [Dataset] doi: 10.18112/openneuro.ds002422.v1.1.0*" e tratta da Andy's Brain Book [38]; ciò ha permesso di individuare aspetti importanti da tenere in considerazione nelle analisi della connettività. Per esempio, occorre verificare che dopo il preprocessing le immagini siano ben allineate al template MNI, una maschera che delinea i contorni anatomici della materia grigia, la segmentazione abbia estratto correttamente le tipologie di tessuto cerebrale e che la distribuzione di connettività dopo il denoising sia simmetrica e centrata. Nella Figura 22 sono presentati i suddetti aspetti.

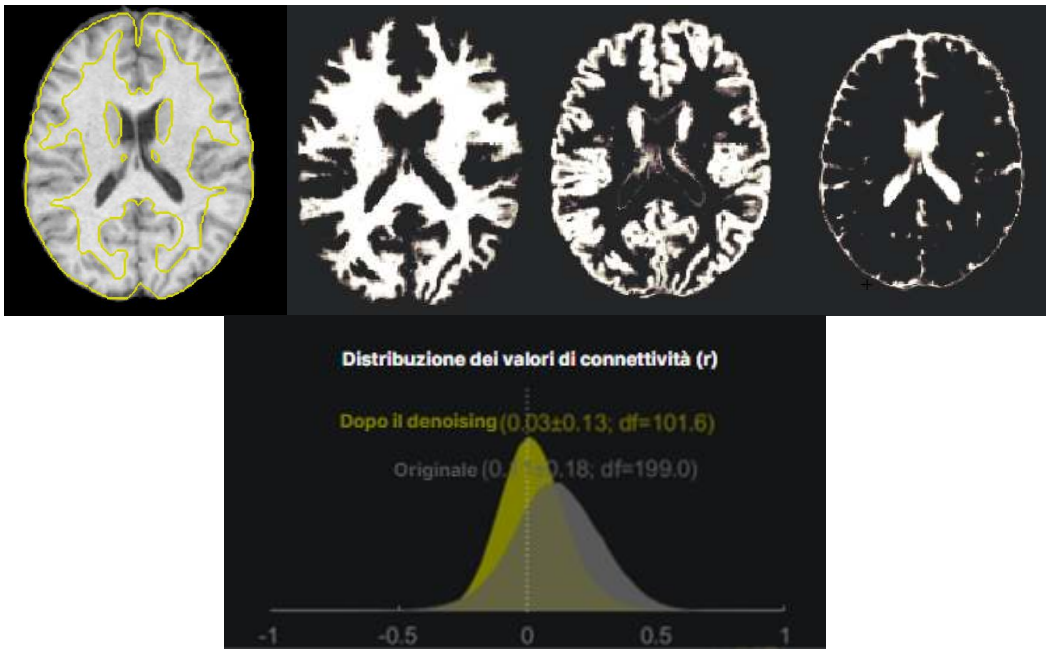


Figura 22: In alto a sinistra l'immagine anatomica è ben allineata al template MNI (in giallo). Adiacente alla suddetta i tessuti cerebrali estratti dalla segmentazione, da sinistra a destra la sostanza bianca, la materia grigia e il liquido cefalorachidiano. In basso le distribuzioni di connettività prima e dopo il denoising [38].

A questo punto, procedendo con l'analisi SBC, con correlazione bivariata, si valuta la correlazione del segnale BOLD di ogni voxel con quello della ROI selezionata. Possiamo concentrare l'attenzione, per esempio, sulla rete cerebrale **DMN** che comprende la corteccia mediale prefrontale (MPFC), il lobo parietale sinistro (LP(L)), il lobo parietale destro (LP(R)) e la corteccia cingolata posteriore (PCC). Fissando una soglia al valore di connettività parie a 0,25, per migliorare la visualizzazione, si può osservare in Figura 23 l'attivazione della rete dalla mappa SBC prodotta; tutte le immagini mostrano, infatti, picchi di connettività in corrispondenza delle regioni costituenti la DMN ed evidenziando dunque l'interregionalità della correlazione.

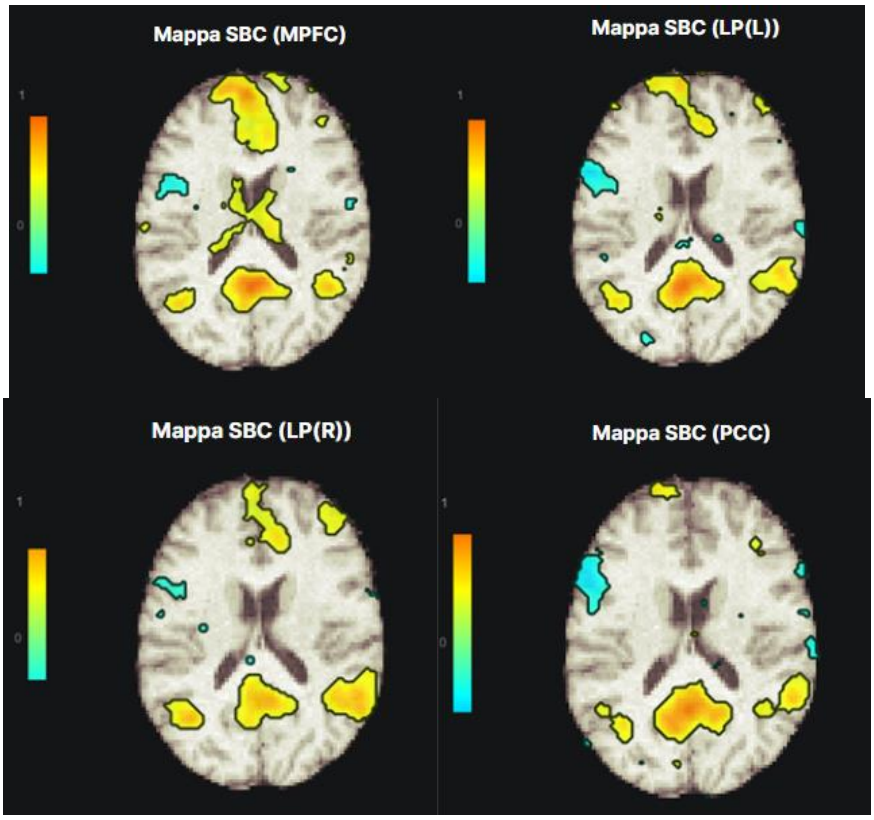


Figura 23: Mappe SBC dell'attivazione cerebrale rispetto alle ROI della default mode network, nel soggetto prelevato dal database open source. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le seguenti ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). Il valore di connettività è codificato da un colore dall'azzurro, correlazione negativa, al rosso, correlazione positiva. Sono visibili solo correlazioni associate ad un valore maggiore di 0.25 o minore di -0.25.

È auspicabile che questo modello di attivazione si presenti, seppur assumendo una certa variabilità intersoggettiva, nel soggetto sano in esame.

Una possibile problematica della SBC deriva dall'asimmetria tra ROI e voxel dal momento che si misura la correlazione tra la serie temporale di un voxel e la media delle serie temporali dei voxel compresi nella ROI considerata. Si ricorre, allora, alle metriche ROI-to-ROI che evitano questa asimmetria, permettendo di quantificare la connettività tra coppie di ROI. In Figura 24, una tipica matrice RRC codificata associando un colore dal blu al rosso al coefficiente di correlazione tra coppie di ROI. Complessivamente, tutte le 8 networks (Default Mode Network, Sensorimotoria, Visiva, Salience / Cingolo-Opericolare, Dorsale dell'attenzione, Frontoparietale / Centrale Esecutiva, Linguaggio, Cerebellare) comprese nelle ROI precedentemente definite in fase di setup sono ben visibili; inoltre, si notano sporadiche attivazioni simultanee di regioni appartenenti a networks differenti ma evidentemente funzionalmente connesse.

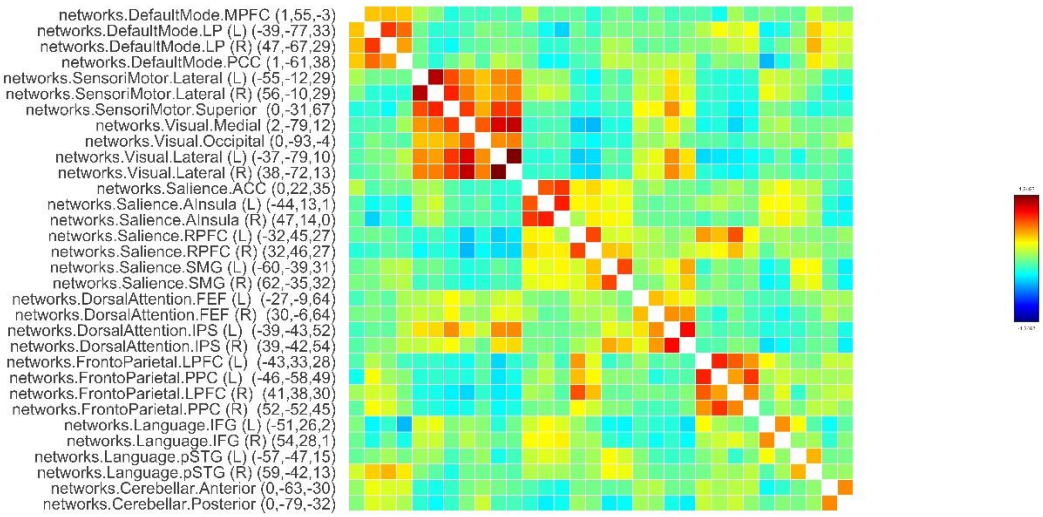


Figura 24: Matrice RRC del soggetto sano prelevato dal database open source. La barra cromatica mostra la codifica di colore utilizzata, rosso per correlazioni fortemente positive e blu per correlazioni fortemente negative. Sull'asse y sono indicate le R

5.2 Risultati dell'analisi su un soggetto sano

Sulla base delle informazioni ottenute dall'analisi guidata è stata stabilita una pipeline di riferimento per l'analisi della connettività su un soggetto sano. Le immagini anatomiche e strutturali hanno quindi subito le fasi sopra descritte di preprocessing, denoising, analisi SBC e RRC. Sono stati specificati l'ordine ascending, dalla tipologia bottom-up di acquisizione, per la fase di correzione slice-timing e un kernel di smoothing di 5 mm FWHM; in Figura 25 le immagini per il controllo qualità dell'elaborazione.

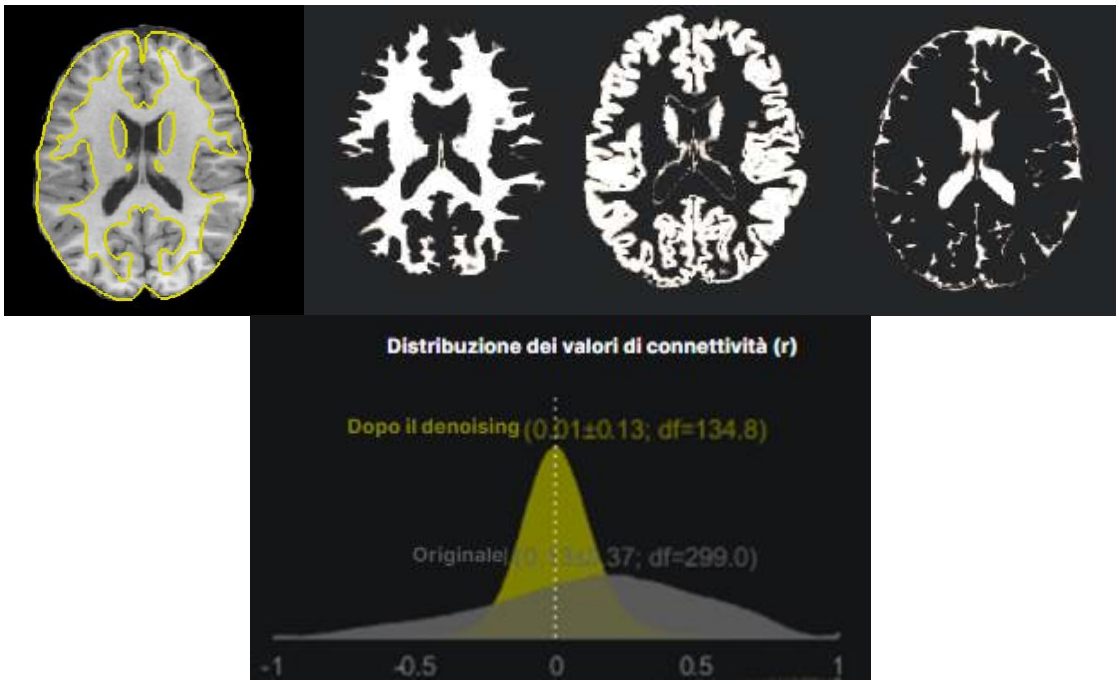


Figura 25: Controllo qualità del preprocessing e denoising sul soggetto sano. In alto a sinistra l'allineamento dell'immagine anatomica al template MNI, a destra i tessuti cerebrali estratti e in basso le distribuzioni della connettività prima e dopo il denoising.

In Figura 26, i risultati dell'analisi SBC, con correlazione bivariata, sul paziente sano per le regioni di interesse comprese dalla DMN. Come si può notare è possibile riconoscere le regioni in tutte le mappe considerate, vale a dire che si riscontra connettività funzionale tra ciascuna ROI e molti voxel contenuti in ogni altra ROI facente parte della DMN.

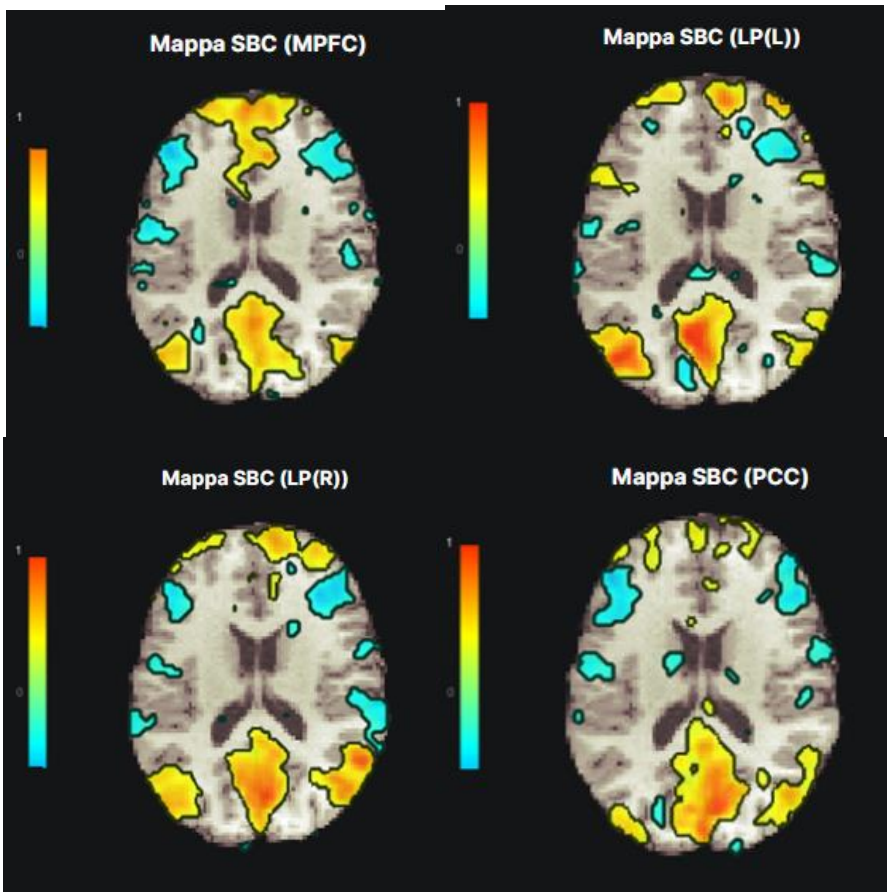


Figura 26: Mappe SBC per il soggetto sano rispetto alle ROI della default mode network. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). Il colore azzurro codifica per un valore negativo di connettività mentre il rosso per una correlazione positiva. Valori di connettività nell'intervallo [-0.25; 0.25] non sono mostrati.

La matrice RRC, con correlazione bivariata, permette, anche in questo caso, di osservare la connettività tra coppie di ROI. In vista dell'analisi sul paziente split-brain è di particolare interesse individuare le network che contengono ROI speculari, cioè, poste in emisferi differenti ma nella stessa regione anatomica. In Figura 27, le frecce di colore nero evidenziano la correlazione positiva tra coppie di ROI speculari destre e sinistre, dette anche omotopiche.

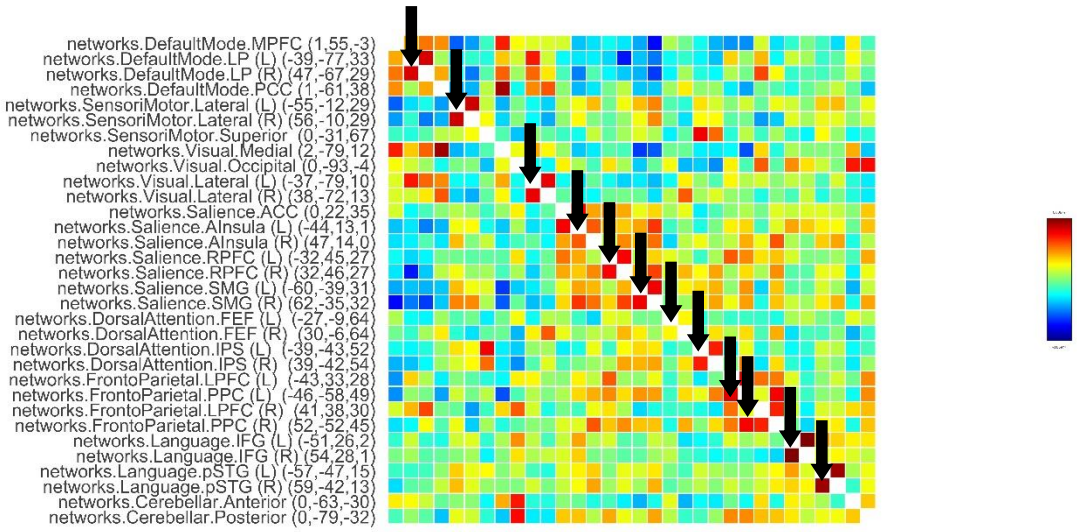


Figura 27: Matrice RRC per il soggetto sano. La colorazione degli elementi della matrice segue la codifica espressa dalla barra cromatica, rosso per correlazioni, tra coppie di ROI, fortemente positive e blu per correlazioni fortemente negative. Sull'asse y sono indicate le ROI costituenti delle otto reti cerebrali considerate.

Infine, scegliendo la correlazione semiparziale, considerando l'influenza delle altre ROI sulla correlazione tra la coppia di ROI studiata otteniamo la seguente matrice mRRC (Figura 28). Ciò che si può osservare è che complessivamente vengono evidenziate, da un colore rosso associato a correlazione positiva, due tipologie di coppie di ROI: le ROI omotopiche e alcune ROI facenti parte della stessa network. Nella prima tipologia ricadono ad esempio le LP(L) e LP(R) della DMN, le cortecce sensorimotorie laterali destre e sinistre e le visive laterali destre e sinistre; tutte queste sono indicate da una freccia di colore nero. Un esempio della seconda tipologia è dato dalla corteccia rostrale prefrontale sinistra (RPFC (L)) e la corteccia cingolata anteriore (ACC) che appartengono alla stessa rete della Salienza.

In altre parole, si indica una comunicazione diretta tra le coppie di ROI non influenzata o mediata sensibilmente da tutte le altre ROI.

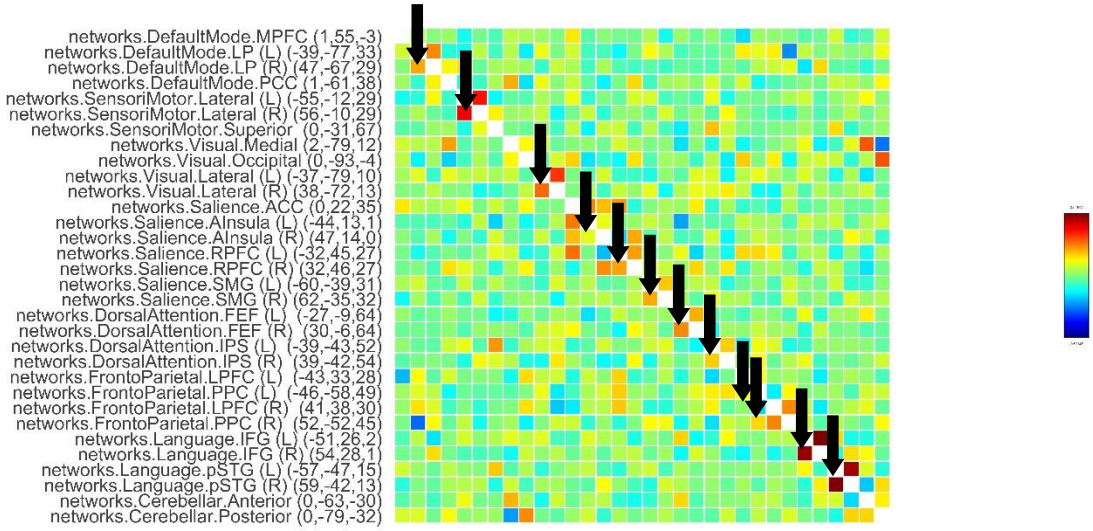


Figura 28: Matrice mRRC, per il soggetto sano. La codifica cromatica (colore rosso per correlazione positiva e blu per correlazione negativa) è indicata dalla barra cromatica. Sull'asse y le ROI ordinate per appartenenza alle rispettive network. Le frecce di colore nero segnalano la presenza di elementi della matrice associati a coppie di ROI speculari.

5.3 Risultati dell'analisi sul paziente split brain

Come per le analisi precedenti, il primo step di verifica della qualità del preprocessing e denoising è stato eseguito, come si osserva in Figura 29.

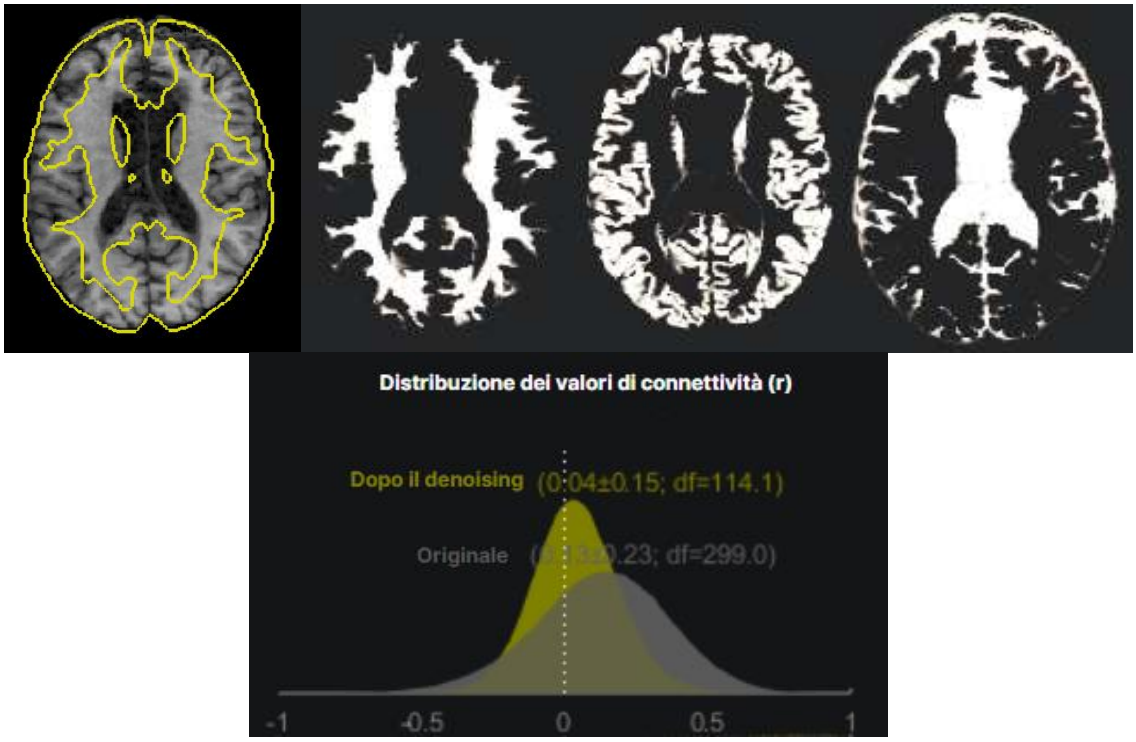


Figura 29: In alto a sinistra l'immagine strutturale allineata al template MNI, a destra i tessuti cerebrali e in basso le distribuzioni della connettività prima e dopo il denoising

Di seguito le analisi SBC con correlazione bivariata della DMN (Figura 30). Non si individuano chiaramente le regioni normalmente comprese nella DMN; in particolare per quanto riguarda i lobi parietali sinistro e destro non sembra essere presente connettività funzionale tra loro, si può vedere quindi una certa lateralizzazione. D'altro canto, per ogni ROI si registra omogeneità della correlazione tra voxel appartenenti alla ROI considerata e la ROI stessa; infatti, i voxel compresi nella MPFC, quando si seleziona la MPFC, mostrano una correlazione con la regione stessa, e quindi un colore tendente al rosso che si espande a comprendere gran parte dei voxel costituenti la

MPFC. Possiamo testimoniare lo stesso per tutte le altre ROI comprese nella DMN, cioè PCC, LP(R) e LP(L). Inoltre, appare evidente come nel caso dei lobi parietali la MPFC e la PCC siano equamente divise in due regioni speculari funzionalmente connesse rispettivamente ai due lobi parietali destro e sinistro. Tutte le regioni possono così essere osservate nella loro interezza solo selezionandole singolarmente come regioni di interesse dell'analisi eseguita.

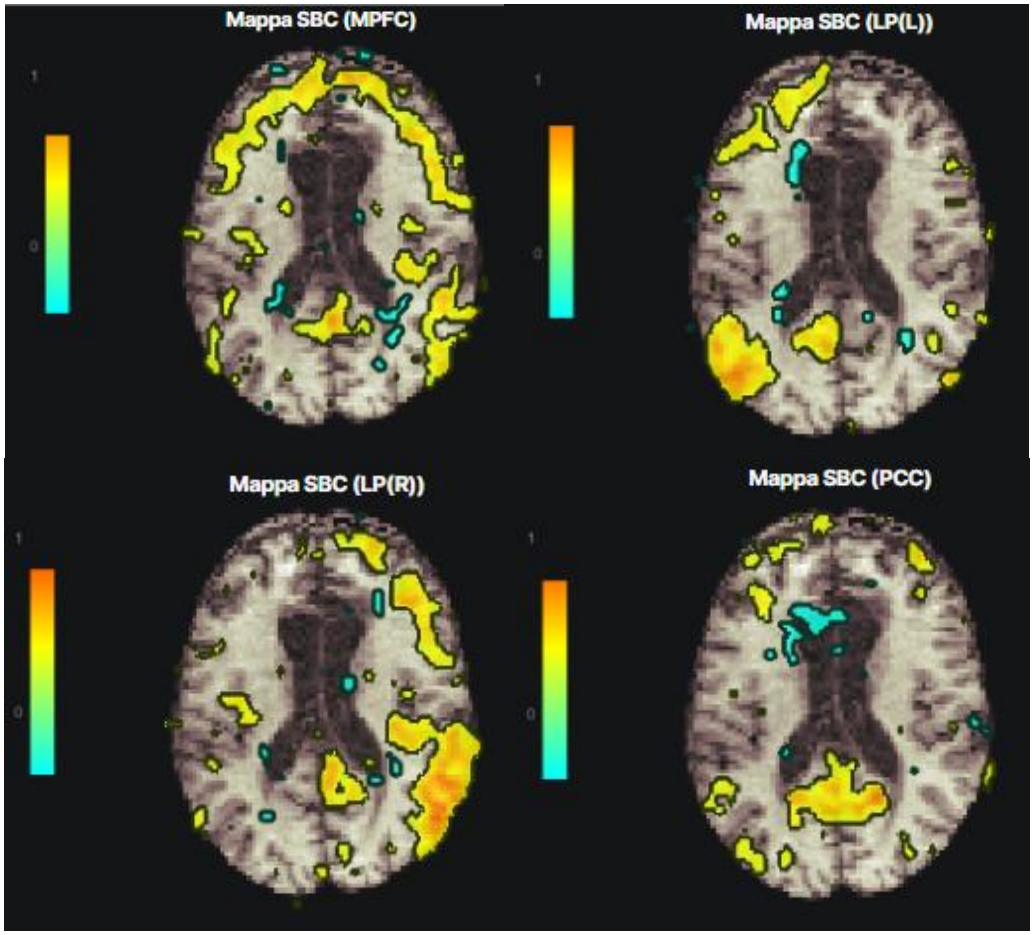


Figura 30: Mappe SBC del paziente split-brain rispetto alle ROI della default mode network. A partire dall'immagine in alto a sinistra, procedendo in senso orario, sono state selezionate le ROI: corteccia prefrontale mediale (MPFC), lobo parietale sinistro (LP(L)), lobo parietale destro (LP(R)) e corteccia cingolata posteriore (PCC). La connettività è codificata con un colore dall'azzurro, per valori negativi di connettività, al rosso, per valori positivi. Valori di connettività nell'intervallo [-0.25; 0.25] sono esclusi dalla visualizzazione.

In conclusione, le matrici RRC con correlazione bivariata e semiparziale sono state prodotte. In Figura 31 e Figura 32 sono state evidenziate attraverso delle frecce di colore nero gli stessi elementi matriciali indicati anche nel soggetto sano e corrispondenti alle ROI speculari che mostravano la bilateralità della connettività nel soggetto sano; da una prima analisi queste ROI speculari, destre e sinistre, presentano una connettività funzionale minore rispetto al soggetto sano; questo è evidente nella matrice mRRC in cui non si evidenziano sensibili attivazioni lungo la diagonale, come succedeva invece per il soggetto sano. Eccezione individuabile per le seguenti coppie di ROI speculari: Sensorimotoria laterale e la corteccia del campo visivo frontale nella rete Dorsale dell'attenzione (in inglese frontal eye field (FEF)).

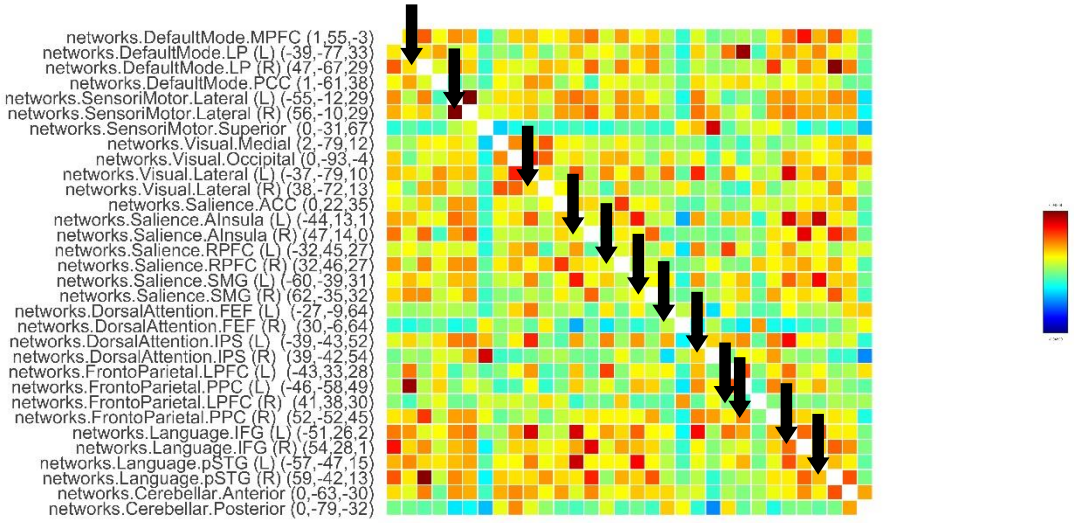


Figura 31: Matrice RRC per il paziente split-brain. Il colore degli elementi della matrice tende al rosso, in corrispondenza di coppie di ROI correlate positivamente, e al blu, in corrispondenza di coppie di ROI correlate negativamente. Sull'asse y le etichette che riportanto i nomi delle ROI appartenti alle otto resting state network considerate.

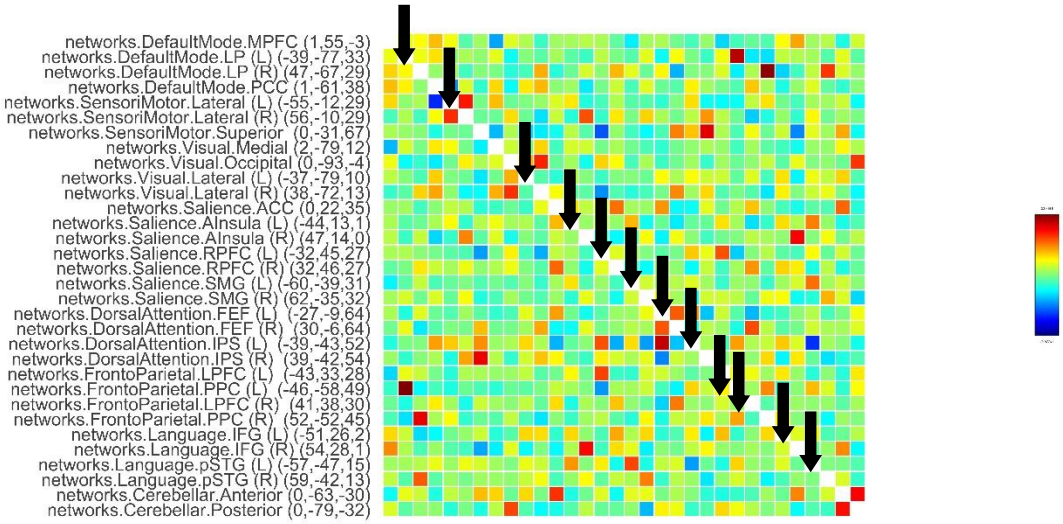


Figura 32: Matrice mRRC per il paziente split-brain che mostra la connettività funzionale tra le coppie ROI costituenti le otto reti cerebrali allo stato di riposo. Una codifica cromatica che associa un colore tendente al rosso agli elementi che indicano correlazione positiva e un colore tendente al blu agli elementi che indicano correlazione negativa.

Si può notare che, mentre per la matrice di correlazione bivariata la corteccia FEF aveva una connettività bassa, il valore finale è elevato nella matrice di correlazione semiparziale.

5.4 Risultati del confronto delle analisi ROI-to-ROI tra soggetto sano e paziente split-brain

Dopo la valutazione visiva delle differenze di connettività funzionale tra soggetto sano e paziente split-brain, grazie alle mappe SBC e le matrici RRC, è opportuno svolgere un confronto puntuale degli effettivi valori di connettività trovati. A partire dalla definizione della matrice differenza (paragrafo 4.4.5) possiamo fare le seguenti considerazioni sugli elementi della Figura 33:

- Valori prossimi al massimo (0,49) indicano coppie di ROI funzionalmente connesse in maniera maggiore nel soggetto sano rispetto al paziente split-brain;
- Valori prossimi al valore medio (0) indicano coppie di ROI la cui connettività allo stato di riposo è simile o nulla in entrambi i soggetti;
- Valori prossimi al valore minimo (-0.59) evidenziano coppie di ROI che hanno una maggiore connettività funzionale nel paziente split-brain rispetto al soggetto sano;
- Valori sulla diagonale sono di default di colore blu scuro.

Alla luce di queste assunzioni, notiamo complessivamente una maggiore connettività per il soggetto sano lungo la diagonale principale; le frecce di colore nero permettono di visualizzare le ROI speculari, come nelle analisi precedenti.

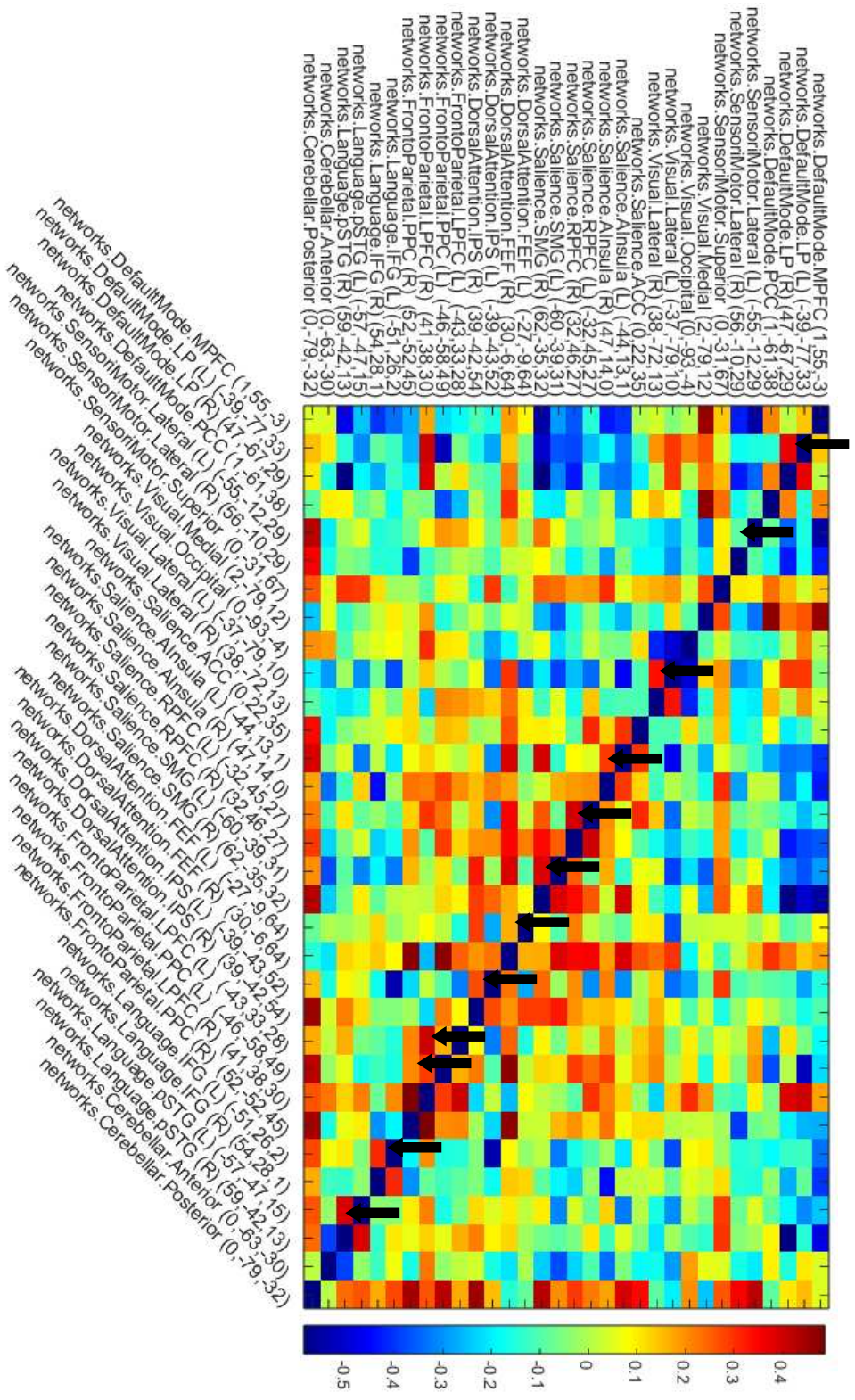


Figura 33: Matrice Zdiff ottenuta tramite normalizzazione delle matrici RRC e differenza tra soggetto sano e paziente. La codifica cromatica associa un colore tendente al rosso a valori più positivi e un colore tendente al blu a valori più negativi. Sugli assi sono riportate le ROI costituenti le principali otto resting state networks.

Mentre si evidenzia per il lobo parietale della DMN, la corteccia visiva laterale, l'insulare, la prefrontale rostrale, il giro sopramarginale, il campo visivo frontale, il solco intraparietale, la corteccia cingolata posteriore, il giro frontale inferiore e il giro sopramarginale posteriore un'accentuata bilateralità nel soggetto sano rispetto al paziente, la corteccia sensorimotoria laterale e il campo visivo frontale (FEF) mostrano una connettività simile o maggiore nel paziente split-brain rispetto al soggetto sano.

5.5 Risultati del Dynamic Causal Modelling su un database open source

Attestare la dipendenza statistica tra due regioni cerebrali non esaurisce in assoluto le informazioni che si possono trarre dalla loro attività; rimane da chiarire l'effetto che l'una ha sull'altra, chiamata anche influenza causale diretta o connettività effettiva. Applicando lo spectral DCM otteniamo i risultati in Figura 34, in cui la forza della connettività effettiva di ognuna delle VOI contro ognuna delle altre è espressa da una frequenza in Hz; per le connessioni estrinseche, cioè interregionali, un valore positivo indica un effetto di eccitazione mentre negativo un'inibizione. Le connessioni intrinseche, o autoconnessioni (ad es. PCC vs PCC), se di valore positivo aumentano l'autoinibizione, cioè un effetto inibitorio intrinseco alla stessa VOI, se negative la diminuiscono [37]. Occorre controllare la probabilità dei parametri stimati, che dovrebbe, idealmente, essere superiore alla soglia del 90%.

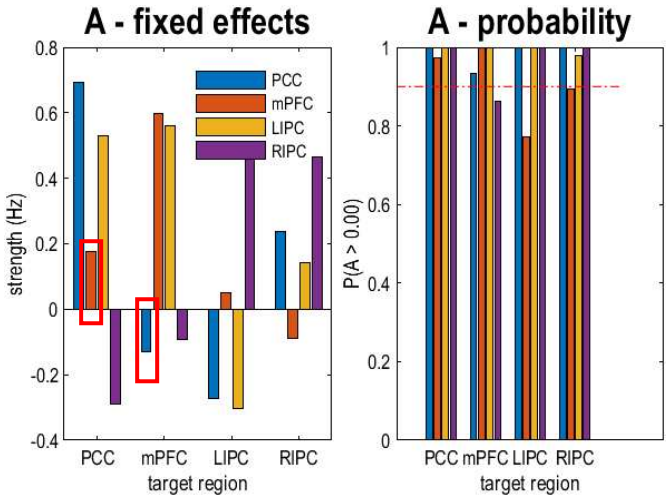
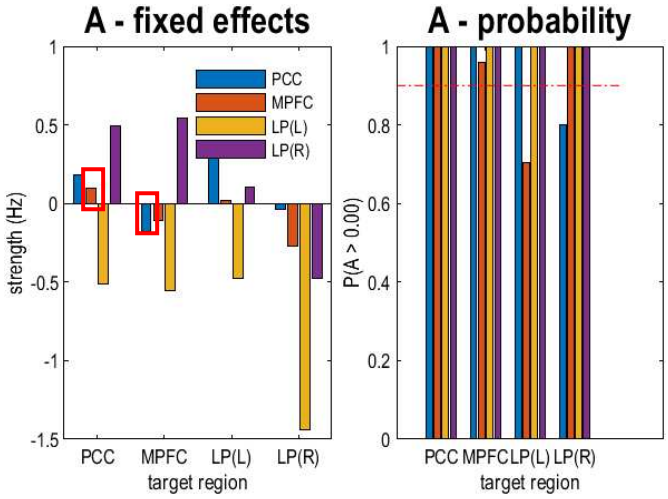


Figura 34: Risultati del DCM per il soggetto prelevato dal database open source. A sinistra la stima dei parametri della matrice A. Per distinguere le regioni, è stato associato un colore ad ognuna: blu, rosso, giallo e viola rispettivamente per PCC, mPFC, LIPC, RIPC. A destra la probabilità a posteriori dei parametri ottenuti.

Ripetendo la stessa analisi per il soggetto sano e il paziente split-brain otteniamo i seguenti risultati di Figura 35.



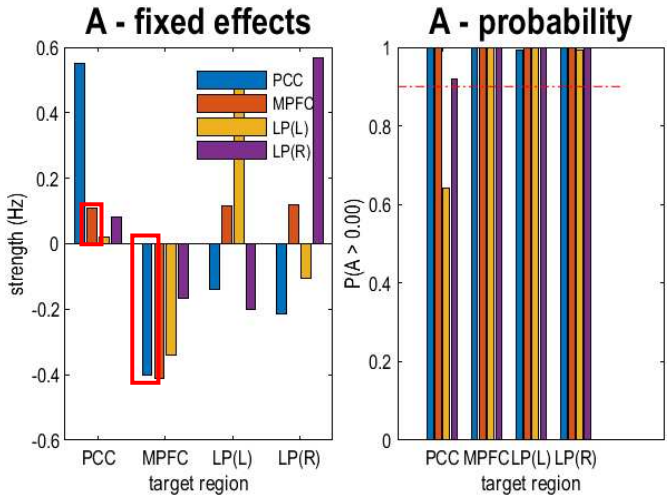


Figura 35: Risultati del DCM per il soggetto sano, in alto, e per il paziente split-brain, in basso. In entrambi i casi, sulla sinistra la stima dei parametri della matrice A, sulla destra la probabilità a posteriori dei parametri ottenuti. Per distinguere le regioni, è stato associato un colore ad ognuna: blu, rosso, giallo e viola rispettivamente per PCC, mPFC, LIPC, RIPC.

La grande sfida nell'uso del DCM per lo studio della connettività effettiva allo stato di riposo consiste nel fatto che non si può specificare un modello senza alcuna assunzione a priori. In questo caso è stato assunto, per esempio un modello completamente connesso, mentre in altre ricerche, come [36], diversi modelli di connessione sono stati testati. Nonostante la complessità del metodo, alcuni risultati previsti possono essere osservati; infatti, dalla letteratura si evince che esiste una interazione causale tra mPFC e PCC, evidenziata da una simile forza di connessione (in Hz) da mPFC a PCC e viceversa, con associata una comune probabilità a posteriori. Entrambe queste caratteristiche sono individuabili per il soggetto prelevato dal database open source e per il soggetto sano studiato mentre non sono osservabili nel paziente split-brain.

6 Discussione

Sebbene l'analisi ICA di dati fMRI abbia il vantaggio di essere totalmente esplorativa, considerando per l'analisi tutti i voxel contemporaneamente, una volta determinate, con un discreto livello di confidenza (in CONN mediante un'analisi ICA su 497 pazienti sani), quelle che sono le regioni costituenti le network cerebrali attive nello stato di riposo si può optare per un approccio di analisi della connettività basato sulle stesse, come attuato nella tesi mediante SPM; questo permette di concentrare l'attenzione sull'attivazione delle ROI nel contesto di **sistemi complessi multi-network**, come il cervello nello stato di riposo; inoltre, usando questo approccio non si presenta il problema della dimensionalità, in ICA nella scelta del numero di componenti da estrarre, e si limita decisamente il tempo di computazione causato dall'uso di numerosi parametri e iperparametri.

Data la grande influenza dei rumori strumentali e fisiologici del paziente sulle analisi nello stato di riposo, hanno avuto un ruolo fondamentale le procedure di **preprocessing** e **denoising**. Per la prima, la scelta del kernel di smoothing a 5 mm FWHM ha consentito di ottenere un buon compromesso tra un miglioramento del rapporto segnale/rumore e il mantenimento di eventuali segnali di interesse. Nella procedura di denoising definire un intervallo di frequenze adeguato, da 0,008 Hz a 0,09 Hz, comporta una minimizzazione dell'influenza di rumori indesiderati, così come applicare una regressione lineare sulle sorgenti di confondimento quali la sostanza bianca, il liquido cefalorachidiano e i segnali strumentali e di movimento. Tutto ciò concorre nel diminuire il bias positivo dei valori di connettività tra i voxel permettendo il processo inferenziale.

L'analisi si conclude producendo due tipologie di mappe di connettività chiamate SBC e RRC. Entrambe risultano dal calcolo di coefficienti di correlazione bivariata Fisher-trasformati ma se la prima permette di studiare nel dettaglio soltanto una singola network alla volta, le mappe, o matrici, RRC assolvono alla funzione di confrontare tutte le ROI a due a due simultaneamente, quello che si desiderava in partenza.

Le **mappe SBC** prodotte soddisfano complessivamente le attese in quanto per il soggetto sano si osservano, riguardo le network selezionate, connettività funzionale tra i voxel di tutte le regioni e ciascuna delle regioni, mentre, nel paziente, i voxel delle regioni appaiono funzionalmente connessi alla regione di appartenenza, talvolta a parti di regioni della network che si trovano nello stesso emisfero, ma molto raramente a voxel delle altre regioni nella loro interezza e ancora più raramente a voxel appartenenti a regioni collocate nell'emisfero opposto. Questi risultati sembrano compatibili con la condizione del paziente split-brain, mancante della principale via di comunicazione interemisferica e dunque, in linea di principio, incapace di consentire una normale connettività funzionale tra regioni poste in emisferi opposti. Nello studio [5] su soggetti analizzati prima e dopo la callosotomia è stato attestato il ruolo del corpo calloso nel mantenimento della connettività interemisferica. In particolare, le mappe SBC estratte sono simili a quelle ottenute nella tesi in quanto mostrano scarsa o nessuna connettività tra regioni appartenenti a emisferi opposti nei soggetti dopo la callosotomia, come si osserva anche per il paziente analizzato (paragrafo 5.3). Simili risultati ottenuti anche in [39] per il soggetto dopo una resezione completa del CC.

Le **matrici RRC** ci consentono di osservare le particolarità sopra indicate per tutte le ROI; quindi, troviamo, per il soggetto sano, valori elevati di connettività funzionale tra le coppie di ROI appartenenti alla stessa network, anche in corrispondenza di regioni

poste in emisferi diversi. Lo stesso non si può dire per il paziente split-brain, il quale presenta valori di connettività bassi per le network ed in particolare una ridotta connettività tra le regioni speculari in emisferi opposti.

La **matrice** ottenuta dalla **differenza** dei valori delle matrici RRC tra soggetto sano e paziente consente di apprezzare le sostanziali differenze tra i due soggetti; infatti, è evidente una maggiore connettività del soggetto sano lungo la diagonale principale, dove si trovano le ROI omotopiche, e una maggiore connettività per il paziente verso il centro della matrice, tra coppie di ROI non appartenenti alla stessa network. Anche le matrici RRC sono state calcolate nello studio [5] e compatibilmente evidenziano che le ROI speculari in emisferi diversi mostrano connettività funzionale ridotta successivamente all'intervento chirurgico di resezione completa del corpo calloso; lo stesso studio ha trovato una maggiore connettività intraemisferica, visibile verso il centro delle matrici RRC (se si distinguono le ROI per emisferi), dopo l'operazione di callosotomia. Allo stesso modo i pattern di FC intraemisferica sono rimasti presenti anche nel soggetto analizzato in [39].

Una possibile spiegazione per la connettività elevata tra coppie di ROI non appartenenti alla stessa network e in generale per l'accentuata **connettività intraemisferica** nel paziente è il meccanismo che si innesca nel cervello per ovviare alla mancanza di collegamenti interemisferici; è dunque probabile che, al fine di espletare alcune funzioni, il cervello, non avendo disponibilità da parte delle regioni normalmente preposte, recluti altre regioni mediante altri percorsi connettivi, risultando in pattern di connettività diversi dal normale. Nella ricerca [5] l'aumento di connettività intraemisferica è stato collegato a studi sulla FC conseguente ad ictus nei quali è stata

individuato un incremento della FC intraemisferica nell'emisfero controlaterale alla regione colpita [40].

Dopo aver ottenuto il grado di connettività funzionale tra ROI ci si può chiedere se le altre ROI hanno avuto un'influenza sulla determinazione della correlazione tra le singole coppie di ROI; la **correlazione semiparziale** permette proprio di valutare, attraverso una regressione lineare, l'influenza che tutte le ROI hanno sul segnale osservato nella ROI studiata e di tenerne conto nel calcolo di ogni singola correlazione tra quest'ultima e ciascuna delle altre. In queste matrici mRRC si può osservare che tra tutte spiccano le coppie di ROI speculari appartenenti alla stessa network nel soggetto sano mentre notiamo singoli e sporadici valori elevati di connettività distribuiti per la mappa del paziente split-brain.

Queste osservazioni sembrano suggerire che, in particolare per le ROI speculari, la loro connessione non sia particolarmente influenzata dalle altre ROI, in altre parole la loro comune attivazione potrebbe derivare da un **rapporto diretto di comunicazione**; questo spiegherebbe anche perché sia così evidente la minor connettività funzionale nel paziente split-brain tra queste ROI. A conferma di ciò, sempre dal [5], un'importante caratteristica riscontrata è che la connettività di regioni omotopiche si sostiene garantita principalmente dal CC, la più grande struttura di connessione interemisferica; infatti, eseguendo misurazioni periodiche sui pazienti non è stata osservata alcuna evidenza di recupero della FC interemisferica.

Per quanto riguarda l'**eccezione** segnalata nella connettività di regioni speculari per il paziente, evidente per la **corteccia sensorimotoria laterale**, anche in [5] si è presentata la permanenza, nei pazienti dopo la callosotomia, di regioni omotopiche funzionalmente

connesse, in particolare nell'area sensorimotoria e visiva; ciò è stato associato alla presenza di altre strutture assonali connettive che consentono una comunicazione indipendente dal CC.

Infine, una volta attestata l'esistenza di connettività funzionale tra le regioni della DMN vale la pena provare ad investigare come avvenga la comunicazione tra le regioni. Nel **DCM** si è scelto di studiare relazioni di reciproca connettività effettiva tra le ROI perché da uno studio precedente ([36]), tra le varie possibili configurazioni di comunicazione interregionale il modello completamente connesso è risultato vincitore nel processo di selezione. Dallo stesso sono risultate relazioni di influenza causale tra la MPFC e il PCC e viceversa, con una forza di connettività effettiva e probabilità a posteriori simile [36]. Lo stesso è stato osservato nel soggetto sano studiato mentre nel paziente risultano parametri di connettività effettiva di entità differente se paragoniamo le due direzioni (da MPFC a PCC e da PCC a MPFC). Insieme questi risultati potrebbero avvalorare l'ipotesi dell'alterata modalità di comunicazione all'interno della DMN nel paziente split-brain. Volendo esplorare questa ipotesi si dovrebbe implementare una matrice di connettività alternativa per il paziente che preveda una comunicazione causale tra le sole regioni effettivamente in grado di comunicare dopo l'intervento di callosotomia.

In [36], è stato ipotizzato che la PCC sia condizionata da tutte le altre ROI della DMN e possibilmente anche da altre regioni cerebrali, costituendo quindi un hub tra network funzionali e attribuendo alla DMN un più alto ordine corticale rispetto alle altre network secondarie. In questa prospettiva potrebbe essere significativo indagare, allora, sull'effetto collaterale nella connettività effettiva tra le ROI della DMN e le altre network nel paziente split-brain.

Conclusione

L'analisi della connettività funzionale è attualmente uno degli strumenti più importanti per la comprensione del funzionamento del cervello. La sua applicazione a soggetti sani è di grande interesse ma esplorando condizioni patologiche, come la callosotomia, è possibile trarre preziose informazioni. Lo **scopo della tesi** è stato quello di analizzare la connettività funzionale in un soggetto sano e in un paziente split-brain in modo da comprendere l'effetto dell'operazione sul funzionamento cerebrale. Sebbene il campione analizzato fosse ristretto si sono potute osservare caratteristiche peculiari, note in letteratura, per il paziente split-brain ed esplorare modalità alternative e complementari di analisi della connettività. Nel complesso è risultato possibile individuare una marcata **inferiore connettività interemisferica** tra regioni omotopiche della stessa network nel paziente rispetto al soggetto sano e una **connettività intraemisferica accentuata** nel paziente rispetto al controllo. In accordo con studi precedenti, le regioni omotopiche dell'area sensorimotoria laterale sono risultate funzionalmente connesse anche nel paziente split-brain, avvalorando la tesi dell'importanza per la FC di **vie di comunicazione alternative** al CC. L'indagine sull'EC all'interno della DMN ha, infine, apportato prodromi sull'**alterata influenza causale** tra le regioni cerebrali per il paziente split-brain.

Naturalmente, le conclusioni tratte nella presente tesi devono essere portate al vaglio di un'analisi su un database più ampio di soggetti per avere rilevanza statistica. Inoltre, investigazioni future potrebbero essere indirizzate alla ricerca delle modalità di comunicazione tra regioni anatomicamente non connesse, mediate, ad esempio, da ulteriori aree cerebrali.

Bibliografia

[1] M. N. Levi, B. M. Koeppen e B. A. Stanton, Principi di Fisiologia di Berne & Levy, Elsevier, 2007.

[2] P. J. Bazira, «An overview of the nervous system,» *Surgery (Oxford),* vol. 39, n. 8, pp. 451-462, 2021.

[3] E. P. WidMeier, R. Hersel e K. T. Strang, Vander Fisiologia, seconda edizione., Casa Editrice Ambrosiana, 2018.

[4] L. Paul, W. Brown, R. Adolphs, J. Tyszka, L. Richards, P. Mukherjee e E. Sherr, «Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity,» *Nat Rev Neuroscience,* vol. 8, n. 4, pp. 287-99, 2007.

[5] J. Roland, A. Snyder, C. Hacker, A. Mitra, J. Shimony, D. Limbrick, M. Raichle, M. Smyth e E. Leuthardt, «On the role of the corpus callosum in interhemispheric functional connectivity in humans,» *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 114, n. 50, pp. 13278-13283, 2017.

[6] A. Asadi-Pooya, A. Sharan, M. Nei e M. Sperling, «Corpus callosotomy,» *Epilepsy Behav,* vol.

13, n. 2, pp. 271-8, 2008 Aug.

[7] L. K. Paul, W. S. Brown, R. Adolphs e J. M. Tyszka, «Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity,» *Nature Reviews Neuroscience,* vol. 8, n. 4, pp. 287-299, 2007.

[8] K. Friston, «Functional and Effective Connectivity: A Review,» *Brain Connectivity,* vol. 1, n. 1, pp. 13-36, 2011.

[9] K. Rockland, «About Connections,» *Front Neuroanat.,* pp. 9-61, 2015.

[10] L. JL e W. FG, «A half century of experimental neuroanatomical tracing,» *J Chem Neuroanat.,* vol. 42, n. 3, pp. 157-83, 2011.

[11] Y. Assaf, H. Johansen-Berg e M. Thiebaut de Schotten, «The role of diffusion MRI in neuroscience,» *NMR Biomed,* vol. 32, n. 4, 2019.

[12] Y. Assaf e O. Pasternak, «Diffusion Tensor Imaging (DTI)-based White Matter Mapping in Brain Research: A Review,» *J Mol Neurosci,* vol. 34, pp. 51-61, 2008.

[13] O. Sporns, G. Tononi e R. Ko¨tter, «The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain,» *PLoS Computational Biology,* vol. 1, n. 4, pp. 245-251, 2005.

[14] M. Stampanoni Bassi, E. Iezzi, L. Gilio, D. Centonze e F. Buttari, «Synaptic Plasticity Shapes Brain Connectivity: Implications for Network Topology,» *Int J Mol Sci,* vol. 20, n. 24, 2019.

[15] F. Karl, M. Rosalyn e K. S. Anil, «Analysing connectivity with Granger causality and dynamic causal modelling,» *Current Opinion in Neurobiology,* vol. 23, n. 2, pp. 172-178, 2013.

[16] Y. Gossuin, A. Hocq, P. Gillis e Q. L. Vuong, «Physics of magnetic resonance imaging: From spin to pixel.,» *Journal of Physics D Applied Physics,* vol. 43, 2010.

[17] T. O. M. J. Michael Chappell, Short Introduction to MRI Physics for Neuroimaging, OXFORD NEUROIMAGING PRIMERS.

[18] G. H. Glover, «Overview of Functional Magnetic Resonance Imaging,» *Neurosurg Clin N Am,* vol. 22, n. 2, pp. 133-139, 2011.

[19] K. Friston, C. Price, P. Fletcher, C. Moore, R. Frackowiak e R. Dolan, «The Trouble with Cognitive Subtraction,» *NeuroImage,* vol. 4, n. 2, pp. 97-104, 1996.

[20] J. Bijsterbosch, S. Smith e C. Beckmann, Introduction to Resting State fMRI Functional Connectivity, Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2017.

[21] B. A. Seitzman, A. Z. Snyder, E. C. Leuthardt e J. S. Shimony, «The State of Resting State Networks,» *Top Magn Reson Imaging,* vol. 28, n. 4, pp. 189-196, 2019.

[22] D. Cole, S. Smith e C. Beckmann, «Advances and pitfalls in the analysis and interpretation of resting-state FMRI data,» *Front Syst Neurosci.,* vol. 4, n. 8, 2010.

[23] R. Sladky, K. J. Friston, J. Tröstl, R. Cunnington, E. Moser e C. Windischberger, «Slice-timing effects and their correction in functional MRI,» *NeuroImage,* vol. 58, n. 2, pp. 588-594, 2011.

[24] C. Candemir, «Spatial Smoothing Effect on Group-Level Functional Connectivity during Resting and Task-Based fMRI,» *Sensors,* vol. 23, n. 13, 2023.

[25] A. Nalci, B. Rao e T. Liu, «Nuisance effects and the limitations of nuisance regression in dynamic functional connectivity fMRI,» *Neuroimage,* vol. 184, pp. 1005-1031, 2019.

[26] R. Pati, A. K. Pujari, G. Padmabati e K. Vikas, «Independent Component Analysis: A Review, with Emphasis on Commonly used Algorithms and Contrast Function,» *Computación y Sistemas,* vol. 25, n. 1, pp. 97-115, 2021.

[27] C. F. Beckmann, «Modelling with independent components,» *NeuroImage,* vol. 62, n. 2, pp. 891-901, 2012.

[28] L. Griffanti, G. Douaud, J. Bijsterbosch, S. Evangelisti, F. Alfaro-Almagro, M. F. Glasser, D. E. P., S. Fitzgibbon, R. Westphal, C. Davide, C. F. Beckmann e S. M. Smith, «Hand classification of fMRI ICA noise components,» *NeuroImage,* vol. 154, pp. 188-205, 2017.

[29] R. A. Poldrack, «Region of interest analysis for fMRI,» *Social Cognitive and Affective Neuroscience,* vol. 2, n. 1, pp. 67-70, 2007.

[30] C. Beckmann e S. M. Smith, «Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging,» *IEEE Transactions on Medical Imaging,* vol. 23, n. 2, pp. 137-152, 2004.

[31] [Online]. Available: https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/intro/.

[32] A. Nieto-Castanon e S. Whitfield-Gabrieli, CONN functional connectivity toolbox, Hilbert Press Manual, 2022.

[33] A. Nieto-Castanon, Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN, Hilbert Press, 2020.

[34] S. Whitfield-Gabrieli e A. Nieto-Castanon, «Conn : A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks,» *Brain Connectivity,* vol. 2, pp. 125-41, 2012.

[35] «SPM12 Manual,» [Online]. Available: https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/spm12_manual.pdf#Chap:DCM_rsfmri.

[36] M. Sharaev, V. Zavyalova, V. Ushakov, S. Kartashov e B. Velichkovsky, «Effective Connectivity within the Default Mode Network: Dynamic Causal Modeling of Resting-State fMRI,» *Front Hum Neurosci.,* p. 10:14, 2016.

[37] P. Zeidman, A. Jafarian, N. Corbin, M. L. Seghier, A. Razi, C. J. Price e K. J. Friston, «A guide to group effective connectivity analysis, part 1: First level analysis with DCM for fMRI,» *NeuroImage,* vol. 200, pp. 174-190, 2019.

[38] A. Jahn, «Functional Connectivity and the CONN Toolbox,» [Online]. Available: https://andysbrainbook.readthedocs.io/en/latest/FunctionalConnectivity/CONN_Overview.html.

[39] J. Johnston, S. Vaishnavi, M. Smyth, D. Zhang, B. He, J. Zempel, J. Shimony, A. Snyder e M. Raichle, «Loss of resting interhemispheric functional connectivity after complete section of the corpus callosum,» *J Neurosci. ,* vol. 28, n. 25, pp. 6453-8, 2008.

[40] M. van Meer, K. van der Marel, K. Wang, W. Otte, S. El Bouazati, T. Roeling, M. Viergever, J. Berkelbach van der Sprenkel e R. Dijkhuizen, «Recovery of sensorimotor function after experimental stroke correlates with restoration of resting-state interhemispheric functional connectivity,» *J Neurosci.,* vol. 30, n. 11, 2010.

[41] «https://www.treccani.it/enciclopedia/frenologia/,» [Online].

[42] X. Jin, X. Liang e G. Gong, «Functional Integration Between the Two Brain Hemispheres: Evidence From the Homotopic Functional Connectivity Under Resting State.,» *Front Neurosci.* , vol. 14, n. 932, 2020.

[43] M. Joliot, G. Jobard, M. Naveau, N. Delcroix, L. Petit, L. Zago, F. Crivello, E. Mellet, B. Mazoyer e N. Tzourio-Mazoyer, «AICHA: An atlas of intrinsic connectivity of homotopic areas,» *J Neurosci Methods,* vol. 254, pp. 46-59, 2015.

Ringraziamenti

Non sarebbe stato possibile realizzare questa tesi senza la professionalità e la disponibilità di coloro che mi hanno fatto conoscere ed apprezzare il campo delle neuroscienze e supportato nella ricerca ovvero la Prof.ssa Burattini, la Prof.ssa Fabri e la Dott.ssa Marcantoni. Un ringraziamento sentito al Prof. Gabriele Polonara, direttore Neuroradiologia; Dott.sse Mojgan Ghoushi, Nathalie Herbert, dirigenti medici Neuroradiologia; Marco Valenti, Luca Reversi e Francesco Mariotti, fisici Neuroradiologia; Luigi Imperiale, Lucio Montesi, Simone Marinelli e Alessio Canari, Tecnici Neuroradiologia (acquisizione e salvataggio dati); Dott.ssa Nicoletta Foschi, dirigente medico Neurologia, referente pazienti epilettici; Dott.ssa Simona Lattanzi, professore associato Clinica Neurologica, referente pazienti epilettici; Giusi Piccolantonio, per il lavoro pionieristico e a tutti i pazienti che credono e hanno creduto nel valore della ricerca.

Ringrazio la mia famiglia, i miei amici e tutte le persone che mi hanno accompagnato, incoraggiato e sostenuto in questo percorso. La loro vicinanza mi ha dimostrato che ciò che è condiviso è più bello e realmente significativo.