



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**Analisi di dati fMRI per lo studio della connettività
interemisferica**

**fMRI data analysis for the study of interhemispheric
connectivity**

Relatore:

Prof.ssa Laura Burattini

Rapporto Finale di:

Camilla Galassi

Correlatori:

Dott.ssa Ilaria Marcantoni

Prof.ssa Mara Fabri

Anno Accademico 2022/2023

Abstract

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) consente di acquisire immagini del cervello in tempo reale, rilevando le variazioni del flusso ematico nei diversi distretti cerebrali. Questo approccio non invasivo offre una finestra unica per esplorare l'attività cerebrale e le interazioni tra le regioni cerebrali durante lo svolgimento di compiti specifici o in stato di riposo. La fMRI riveste, infatti, un'importanza cruciale nello studio della connettività cerebrale. Il cervello umano è costituito da due emisferi interconnessi che collaborano attivamente per svolgere una vasta gamma di funzioni cognitive, sensoriali e motorie. Tuttavia, affinché il cervello possa operare in modo ottimale, è essenziale che avvenga uno scambio di informazioni tra gli emisferi. Questo avviene attraverso le commessure cerebrali, strutture che consentono la comunicazione tra le due metà del cervello. La commessura cerebrale più grande è il corpo calloso (CC), che connette una vasta gamma di aree cerebrali e facilita il trasferimento di informazioni e segnali neurali tra gli emisferi. La resezione del CC è una tecnica chirurgica che è stata introdotta come opzione terapeutica per alcuni casi di epilessia grave. Tuttavia, studi hanno rivelato che questa procedura può comportare effetti collaterali e alterazioni nel funzionamento cerebrale dei soggetti coinvolti. In questo lavoro di tesi, si indaga l'effetto della resezione del CC sulla connettività interemisferica utilizzando l'analisi dei dati di risonanza magnetica funzionale di un soggetto sano e di un soggetto split brain, ossia dal cervello diviso. L'obiettivo principale è identificare le reti neurali che mantengono una comunicazione bilaterale nei soggetti con CC sezionato. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il toolbox CONN, uno strumento basato su SPM, in cui le fasi di pre-elaborazione e di rimozione dei rumori indesiderati sono state effettuate sulla base di pipeline predefinite. In seguito, dall'analisi di primo livello, mediante l'approccio seed-based e ROI-to-ROI, sono state calcolate le misure di connettività. Dai risultati ottenuti si evidenzia che nel soggetto split brain alcune delle resting state networks analizzate conservino un buon grado di bilateralità. Nonostante la disconnessione fisica, la Visual Network dimostra ancora una significativa attivazione bilaterale. Inoltre, si osserva la presenza di attivazioni bilaterali anche nella Default Mode Network, nella Sensorimotor Network, nella Salience Network e nella Dorsal Attention Network. L'assenza del CC rappresenta una condizione unica in cui i dati ottenuti suggeriscono la presenza di meccanismi compensatori e di adattamento efficaci nel mantenimento di alcune connessioni interemisferiche. Questi meccanismi dimostrano la straordinaria plasticità del cervello umano, in grado di trovare alternative per consentire la comunicazione tra gli emisferi anche in assenza della principale via di connessione.

Sommario

<i>Introduzione.....</i>	<i>1</i>
<i>Capitolo 1 Anatomia e Fisiologia del cervello umano.....</i>	<i>1</i>
1.1 Neuroni e cellule gliali: generazione e trasmissione degli impulsi elettrici	2
1.2 Materia bianca e materia grigia	7
1.3 Corteccia cerebrale.....	9
1.3.1 Suddivisione anatomica	9
1.3.2 Suddivisione funzionale delle aree cerebrali	11
1.3.3 Aree di Brodmann.....	12
1.4 Lateralizzazione emisferica	14
1.5 Connessioni e disconnessioni tra emisferi	15
<i>Capitolo 2 Neuroimaging: Risonanza Magnetica Funzionale.....</i>	<i>16</i>
2.1 Neuroimaging.....	16
2.2 Risonanza Magnetica Nucleare	17
2.2.1 Generazione delle immagini	22
2.2.2 Modalità di acquisizione delle immagini	25
2.3 Risonanza Magnetica Funzionale	27
2.3.1 Risposta emodinamica.....	27
2.3.2 Effetto Bold	29
2.4 Risonanza Magnetica Funzionale in condizioni di Resting State.....	30
<i>Capitolo 3 Connettività.....</i>	<i>31</i>
3.1 Connettività Anatomica-Strutturale	32
3.2 Connettività Funzionale.....	32
3.2.1 Analisi Statistica di dati fMRI	34
3.3 Networks Cerebrali	37
<i>Capitolo 4 Materiali e Metodi</i>	<i>41</i>
4.1 Il toolbox CONN: descrizione	41
4.2 Metodo di analisi	41
4.2.1 Pipeline di pre-elaborazione.....	43
4.2.2 Denoising pipeline	49
4.2.3 Analisi di primo livello: misure di connettività	51
<i>Capitolo 5 Analisi dei dati</i>	<i>56</i>
5.1 Dataset	56
5.2 Setup	57
5.3 Pre-elaborazione.....	59

5.4 Denoising	69
5.5 Analisi di primo livello: connettività funzionale.....	71
5.6 Risultati	74
<i>Discussione</i>	<i>III</i>
<i>Conclusioni</i>	<i>IV</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>V</i>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>XII</i>

Introduzione

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) è una tecnica di imaging cerebrale non invasiva che consente di studiare la connettività interemisferica. La fMRI misura i cambiamenti del flusso del sangue nel cervello, che sono correlati all'attività neuronale. Utilizzando questa tecnica, è possibile rilevare le regioni cerebrali attivate durante una determinata attività e valutare come queste regioni interagiscono tra loro.

Nel contesto della fMRI, sono utilizzate due modalità principali per studiare la connettività interemisferica: la fMRI a riposo e la fMRI durante compiti specifici. La fMRI a riposo analizza la correlazione temporale dei segnali BOLD (Blood Oxygen Level Development) in diverse regioni cerebrali quando il soggetto è vigile, ma rilassato e in assenza di stimoli esterni. Queste correlazioni temporali tra le fluttuazioni del segnale nelle diverse regioni cerebrali a riposo sono state interpretate come indicatori di connettività funzionale e rappresentate come reti di connettività note come resting-state networks (RSNs).

Il corpo calloso (CC) è una struttura situata nel cervello che svolge un ruolo fondamentale nella comunicazione e nell'integrazione delle funzioni tra i due emisferi. L'uso della fMRI può fornire importanti informazioni sulla connettività interemisferica e sulla funzione del CC nello scambio di informazioni tra gli emisferi cerebrali. La resezione del CC è un intervento neurochirurgico in cui avviene la rimozione totale o parziale di questa struttura, interrompendo così la connessione diretta tra gli emisferi cerebrali. Questa procedura veniva spesso utilizzata in passato nel trattamento di pazienti con grave epilessia; oggi viene considerata solo in casi particolari in cui l'epilessia grave e farmaco-resistente non può essere trattata in altro modo. Studi hanno dimostrato che, nei pazienti con resezione del CC, si osserva una riduzione significativa della connettività interemisferica rispetto ai soggetti sani. Poiché il CC è la principale via di comunicazione tra gli emisferi cerebrali, la sua resezione potrebbe portare a una perdita di integrazione delle attività neurali tra gli emisferi. Ciò può influire sulle funzioni cognitive che richiedono una forte interazione tra le due metà del cervello.

Il confronto tra soggetti sottoposti a callosotomia e soggetti sani può aiutare a comprendere come il cervello si adatta all'assenza del CC. Alcuni studi hanno evidenziato che, dopo la resezione del CC, si possono osservare cambiamenti nella connettività intra-emisferica, con un maggior coinvolgimento delle connessioni intraregionali all'interno dello stesso emisfero. Ciò suggerisce che il cervello cerca di compensare la perdita della connettività interemisferica potenziando le connessioni all'interno di ciascun emisfero.

Lo scopo di questo studio è esaminare come avviene lo scambio di informazioni tra i due emisferi cerebrali in un soggetto sottoposto a callosotomia totale e in un soggetto sano. In questo lavoro di tesi il confronto è stato effettuato utilizzando il toolbox Conn, uno strumento di analisi e visualizzazione open-source finalizzato allo studio della connettività funzionale del cervello mediante dati di imaging cerebrale. Questa risorsa offre un'ampia gamma di funzionalità per l'analisi della connettività, inclusi diversi metodi di pre-elaborazione dei dati, calcolo delle mappe di connettività e analisi statistica. Questa comparazione ci offre l'opportunità di esplorare i meccanismi di adattamento attraverso i quali le due metà del cervello comunicano senza la presenza del CC come intermediario.

Capitolo 1 Anatomia e Fisiologia del cervello umano

Il sistema nervoso centrale (SNC), in base a criteri embriologici, morfologici e funzionali si suddivide in diverse parti, contenute nella cavità cranica (encefalo) e nel canale vertebrale (midollo spinale), circondate da tre membrane meningei [1]. Al suo interno ospita alcune cavità intercomunicanti, i ventricoli, contenenti liquido cefalorachidiano, detto liquor, presente anche nelle cavità intermeningei. Schematicamente, possiamo così distinguere le principali suddivisioni del SNC, illustrate nella Figura 1:

1. Telencefalo: si compone dei due emisferi cerebrali e delle formazioni interemisferiche; ospita, al suo interno le cavità dei ventricoli laterali;
2. Diencefalo: si compone di talamo e ipotalamo; ospita il terzo ventricolo.
3. Mesencefalo: composto dai peduncoli cerebrali e dalla lamina quadrigemina; presenta, come cavità liquorale, l'Acquedotto del Silvio;
4. Rombencefalo: composto da bulbo (detto anche midollo allungato), ponte (tronco encefalico) e cervelletto, presenta come cavità il quarto ventricolo;
5. Midollo spinale; la sua cavità interna è il canale centrale.

Il telencefalo è la parte più rostrale e voluminosa del SNC; esso è chiaramente diviso a metà nei due emisferi cerebrali, separati da una profonda fessura sagittale mediana, la scissura interemisferica. Esso può essere suddiviso in tre strati che verranno approfonditi successivamente: corteccia cerebrale, sostanza bianca e sostanza grigia.

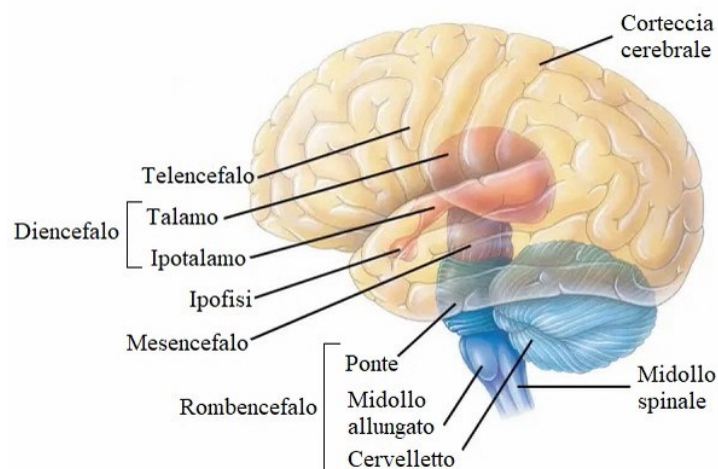


Figura 1: rappresentazione delle principali strutture che compongono l'encefalo (modificata).

1.1 Neuroni e cellule gliali: generazione e trasmissione degli impulsi elettrici

Il sistema nervoso è costituito principalmente da due tipi cellulari: neuroni e cellule gliali.

I neuroni sono cellule specializzate che hanno il ruolo di generare, condurre e trasferire lo stimolo nervoso alle cellule nervose adiacenti. Ogni neurone presenta un corpo cellulare, o soma, dal quale si diramano prolungamenti di varia lunghezza, che si distinguono in dendriti e assone (Figura 2). Quest'ultimo è detto mielinizzato se presenta più strati di rivestimento mielinico, mentre è definito non mielinizzato quando è rivestito da un solo strato di mielina. La guaina mielinica è prodotta da particolari cellule gliali, gli oligodendrociti e le cellule di Schwann.

I dendriti sono strutture molto sottili e ramificate che ricevono segnali in entrata da un recettore sensoriale o da un numero variabile di neuroni con i quali sono interconnessi grazie a giunzioni specializzate, le sinapsi. La funzione primaria dei dendriti è quella di raccogliere i segnali sinaptici che provengono da uno o più neuroni presinaptici e di trasferirli nella regione di integrazione del neurone, il soma.

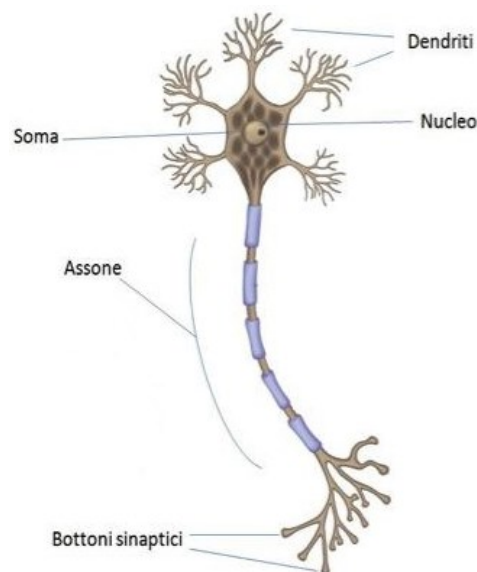


Figura 2: Struttura di un neurone.

Gli assoni originano dal cono d'emergenza che è una speciale regione somatica dove sono espresse alte densità di canali del Na^+ e del K^+ . Il cono d'emergenza è quindi la zona del neurone dove si generano i potenziali d'azione. L'assone è la parte del neurone specializzata nella conduzione dei segnali del tipo tutto-o-nulla e direziona i segnali elettrici in uscita verso le cellule bersaglio. Nella

sua parte finale l'assone si ramifica in un numero variabile di terminazioni dove il segnale elettrico viene convertito in un segnale chimico, viene cioè rilasciato un neurotrasmettitore.

I neuroni possono essere classificati in base al numero dei prolungamenti, della lunghezza dell'assone e delle funzioni espletate.

Tenendo conto del numero dei prolungamenti, i neuroni si distinguono in unipolari, bipolari e multipolari. I neuroni unipolari possiedono un solo prolungamento che funge da assone, mentre la zona recettiva è rappresentata dal corpo cellulare. Un sottogruppo di tali neuroni è rappresentato dai neuroni pseudounipolari, caratterizzati da un breve prolungamento del soma che si divide immediatamente a T generando due prolungamenti citoplasmatici, uno che si dirige verso il SNC, l'altro che raggiunge la periferia. I neuroni bipolari sono composti da un dendrite e da un assone che si originano da due poli opposti del soma. I neuroni multipolari rappresentano la maggioranza in tutto il sistema nervoso. Possiedono numerosi dendriti e un solo assone. Ci sono molti tipi di neuroni multipolari, specialmente in relazione alla lunghezza dell'assone e alle modalità di ramificazione dell'albero dendritico. L'arborizzazione dendritica di questi neuroni è in funzione del numero di contatti sinaptici che il neurone contrae.

In base alla lunghezza assonica, i neuroni si dividono in neuroni di tipo I di Golgi, definiti anche neuroni ad assone lungo, e neuroni di tipo II di Golgi, detti neuroni ad assone breve.

Secondo la loro funzione, i neuroni possono essere distinti in neuroni sensitivi, motoneuroni e interneuroni. I neuroni sensitivi detti anche neuroni afferenti, sono dedicati alla conduzione degli stimoli dai recettori al sistema nervoso centrale. I motoneuroni o neuroni motori, portano istruzioni motorie dagli emisferi cerebrali, dal tronco encefalico o dal midollo spinale agli organi efferenti, ovvero muscoli e ghiandole. Gli interneuroni sono la classe di neuroni più rappresentata e hanno la funzione di collegare e integrare le cellule nervose sensitive per formare una rete di circuiti nervosi.

Oltre ai neuroni, nel sistema nervoso troviamo anche le cellule gliali, le quali svolgono attività di sostegno e trofiche e intervengono nei processi riparativi. Come illustrato nella Figura 3, si distinguono in:

- Astrociti fibrosi, i quali hanno una forma a stella e sono localizzati nella sostanza bianca;
- Astrociti protoplasmatici, localizzati prevalentemente nella sostanza grigia. Si differenziano nella forma da quelli fibrosi per un nucleo più grande e prolungamenti più spessi e corti;
- Oligodendrociti, possiedono un corpo cellulare più piccolo degli astrociti e pochi prolungamenti. La loro funzione principale è quella di produrre mielina avvolgendosi intorno agli assoni.

- Cellule ependimali, sono disposte in un'unica fila e rivestono le pareti dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale. Tali cellule presentano sul versante apicale ciglia dotate di movimento, che facilitano l'avanzamento del liquido cerebrospinale verso le varie cavità encefaliche e microvilli.
- Cellule della microglia, sono elementi di dimensioni ridotte che presentano uno scarso citoplasma, scarsi e brevi prolungamenti e un nucleo piccolo. [2]

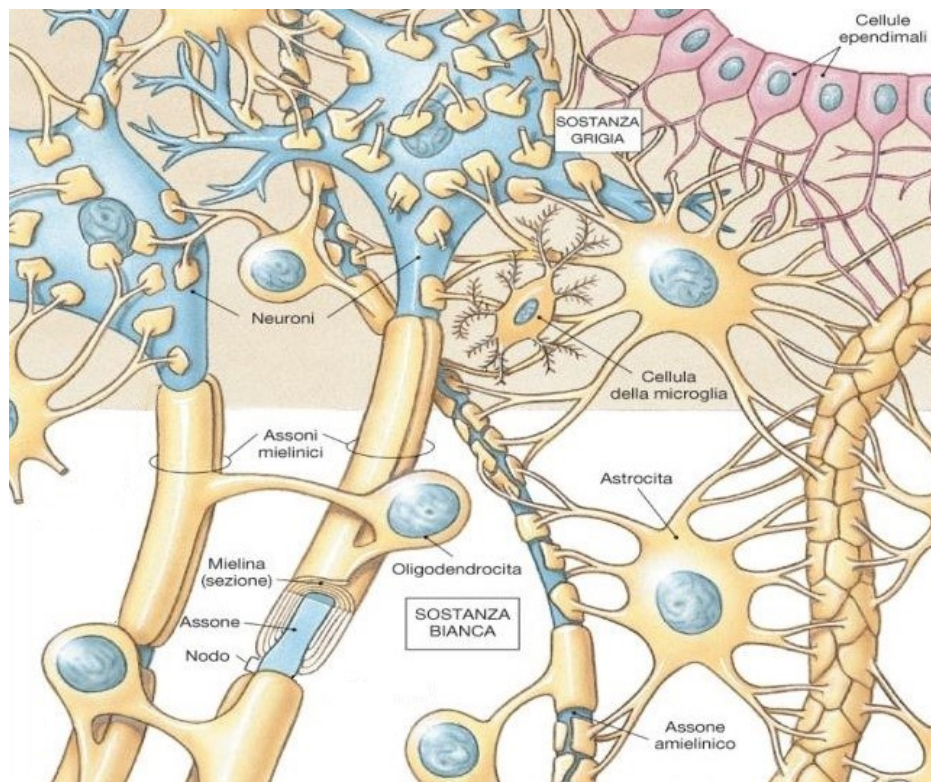


Figura 3: rappresentazione schematica del tessuto nervoso nel SNC che mostra i rapporti tra la neuroglia e i neuroni.

La principale differenza tra i neuroni e le cellule gliali risiede in una proprietà che appartiene solo alla prima classe cellulare: l'eccitabilità. Essa si esprime con eventi elettrici, quali impulsi nervosi (potenziali d'azione), potenziali di recettore e potenziali sinaptici [3].

I neuroni funzionano in tutte le specie trasmettendo un impulso di natura elettrochimica. La membrana plasmatica di un neurone è polarizzata, cioè presenta una differenza di carica elettrica tra l'interno e l'esterno della cellula. Tale differenza è dovuta alla concentrazione degli ioni positivi (soprattutto ioni sodio Na^+), maggiore all'esterno piuttosto che all'interno, e produce una differenza

di potenziale elettrico, detta potenziale a riposo. Il potenziale a riposo viene mantenuto dall'azione di una proteina di membrana – chiamata pompa sodio-potassio – che trasporta in modo attivo ioni Na^+ dall'interno all'esterno della cellula e ioni potassio K^+ dall'esterno verso l'interno. Gli ioni K^+ possono passare liberamente attraverso delle proteine di membrana (chiamate proteine canale per il potassio) e tendono a equilibrare la loro concentrazione, spostandosi dall'interno all'esterno. Anche gli ioni Na^+ si distribuirebbero uniformemente passando attraverso altre proteine (le proteine canale per il sodio), ma ciò non avviene perché quando il neurone è a riposo questi canali sono chiusi. In questo modo il potenziale a riposo è mantenuto costante, attorno al valore di circa -70 mV [4], come mostra la Figura 4. Il repentino cambiamento di questa differenza di potenziale genera l'impulso nervoso, cui segue il ripristino delle condizioni normali. Difatti, se il neurone viene stimolato, a causa dell'apertura di alcune proteine canale per il sodio il potenziale della membrana può salire da circa -70 mV a circa -50 mV , valore definito potenziale di soglia. Raggiunto questo valore di soglia, molti canali per il sodio si aprono e un gran numero di ioni Na^+ passano dall'esterno all'interno della cellula. La concentrazione di cariche positive all'interno aumenta, il potenziale si inverte bruscamente e raggiunge un valore di $+35 \text{ mV}$, detto potenziale d'azione. Questa sequenza di eventi è chiamata depolarizzazione della membrana. Pochi istanti dopo le proteine canale per il sodio si richiudono, mentre quelle per il potassio – che nel frattempo erano chiuse – si riaprono e, grazie all'azione della pompa sodio-potassio, vengono ristabilite le condizioni a riposo. Questo processo è detto ripolarizzazione della membrana. L'impulso nervoso si trasmette lungo la membrana degli assoni delle cellule nervose. Perché si verifichi la trasmissione dell'impulso, la depolarizzazione deve trasmettersi dalla zona in cui è avvenuta al tratto immediatamente adiacente. La propagazione dello stimolo avviene esclusivamente in una direzione grazie al fatto che, nel tratto interessato dal potenziale d'azione, la pompa sodio-potassio sta operando per riportare le condizioni a riposo. La concentrazione di ioni potassio nel liquido interstiziale all'esterno della cellula, per un breve istante, risulta superiore rispetto a quella delle condizioni normali a riposo; ciò determina una iperpolarizzazione della membrana che persiste finché non viene ripristinato il valore di -70 mV . In questo lasso di tempo, detto periodo di refrattarietà, che dura circa 2 millisecondi, la membrana non può ricevere alcuno stimolo.

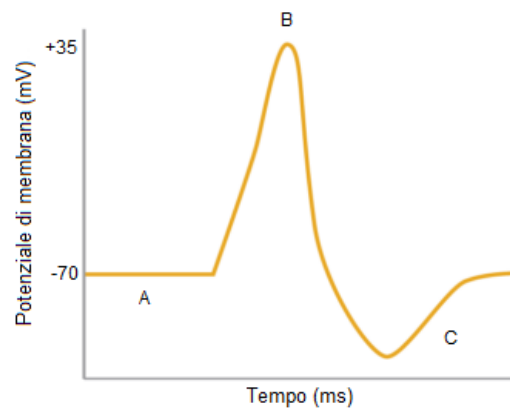


Figura 4: differenza di potenziale sulla membrana nel tempo, in un neurone stimolato. A: potenziale a riposo; B: potenziale d'azione; C: potenziale di riposo ristabilito.

Come abbiamo visto sopra, l'impulso nervoso viene trasferito da una cellula all'altra e alle cellule muscolari attraverso le sinapsi. Un'importante caratteristica delle sinapsi è la loro plasticità, cioè la loro capacità di modificare l'efficienza di funzionamento delle connessioni tra neuroni, di instaurarne di nuove e di eliminarne alcune. Esistono due tipi di sinapsi: le sinapsi elettriche e le sinapsi chimiche.

Nelle sinapsi elettriche il potenziale d'azione passa da una cellula alla successiva con un meccanismo del tutto simile a quello di propagazione dell'impulso all'interno della cellula stessa. Molto spesso le sinapsi elettriche possono trasmettere l'impulso nervoso in entrambe le direzioni.

Le sinapsi chimiche sono presenti dove l'elaborazione degli impulsi è più varia e complessa, ad esempio nel sistema nervoso centrale. Le sinapsi chimiche presentano un piccolo spazio tra il neurone pre-sinaptico e il neurone post-sinaptico ed è questa separazione a impedire il trasferimento diretto dell'impulso elettrico. Nelle sinapsi chimiche, infatti, la trasmissione dell'impulso tra un neurone e il successivo è mediata da alcune sostanze chimiche, contenute in vescicole, dette neurotrasmettitori. Quando l'impulso giunge al termine dell'assone, provoca l'apertura delle proteine canale degli ioni calcio Ca^{++} nel rigonfiamento terminale, chiamato bottone sinaptico. Gli ioni calcio sono presenti in concentrazione maggiore all'esterno della cellula e passano quindi all'interno. Questo evento induce l'esocitosi delle vescicole contenenti i neurotrasmettitori, che attraversano lo spazio sinaptico e si legano alle proteine di membrana (recettori) del neurone post-sinaptico. Il legame provoca l'apertura di canali ionici, permettendo l'entrata di ioni nel neurone post-sinaptico, provocandone la depolarizzazione e dando l'avvio all'impulso nervoso.

1.2 Materia bianca e materia grigia

In una sezione trasversale del cervello e del midollo spinale, osservata macroscopicamente, compaiono due parti di diverso colore (Figura 5): la sostanza grigia, di colore grigio-rossastro, e la sostanza bianca, di colore bianco madreperlaceo.

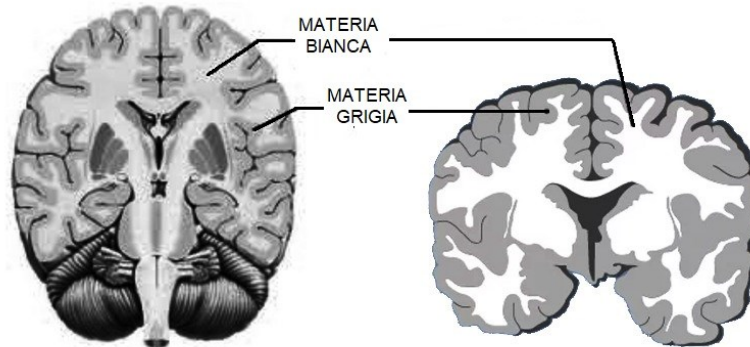


Figura 5: materia bianca e materia grigia [8].

Il termine sostanza bianca viene utilizzato dalla mielinizzazione delle fibre degli assoni che conferisce a quest'area un aspetto bianco. Le fibre degli assoni possono essere suddivise in tre sistemi principali, a seconda del bersaglio degli assoni: fasci di associazione, fasci di proiezione e fasci commissurali. I fasci di associazione collegano diverse regioni all'interno dello stesso emisfero e includono le fibre a U, il fascicolo uncinato, il fascio del cingolo, il fascicolo arcuato, i fascicoli longitudinali superiori e inferiori e il fascicolo occipitofrontale. I fasci di proiezione collegano la corteccia cerebrale con strutture più caudali nel sistema nervoso centrale, come il talamo, il tronco encefalico e il midollo spinale, perciò hanno direzione verticale. Questi fasci si dividono in ascendenti, in cui il potenziale d'azione risale il neurone dirigendosi verso i centri sovraspinali, e discendenti, percorsi dal potenziale d'azione in verso craniocaudale. Infine, i fasci commissurali cerebrali collegano gli emisferi cerebrali sinistro e destro e costituiscono il CC, la commessura anteriore, la commessura posteriore e la commessura ippocampale. Il CC, situato nella scissura interemisferica, permette l'unificazione dell'informazione elaborata in maniera diversa da ciascun emisfero, realizzando la complementarità tra le due metà della corteccia cerebrale. Le fibre callosi costituiscono delle connessioni fra aree corticali correlate a funzioni periferiche motorie e sensitivo-sensoriali. Procedendo in direzione anteroposteriore, nel CC si individuano le seguenti porzioni:

- il rostro, uncinato attorno alla commessura anteriore
- il ginocchio (o genu), che curva dolcemente seguendo il limite inferiore del lobo frontale
- il tronco, che costituisce la maggior parte della porzione visibile del CC
- lo splenio, un rigonfiamento molto spesso, appoggiato sulla lamina quadrigemina, che segna il limite posteriore del CC. [5]

Il tono grigio della materia grigia è ottenuto, invece, da un'alta concentrazione di corpi cellulari neuronali. Gli assoni della materia grigia non sono fortemente mielinizzati, a differenza della materia bianca, che contiene un'alta concentrazione di mielina. [6] La materia grigia contiene la maggior parte dei soma dei neuroni, che in vita fanno apparire il cervello marrone, mentre una volta estratto dal corpo diventa grigio. La materia grigia si trova anche nel midollo spinale, al cui interno crea una struttura simile ad una H maiuscola, circondata da sezioni costituite da materia bianca. A differenza della struttura del midollo spinale, nel cervello la materia grigia è situata nello strato più esterno, noto come corteccia cerebrale. [7] Ci sono anche aree di materia grigia che si trovano nelle sezioni interne del cervello; tuttavia, queste aree non sono conosciute come corteccie, ma sono chiamate nuclei o gangli della base. La materia grigia presenta un gran numero di neuroni, che le permettono di elaborare le informazioni e di rilasciarne di nuove attraverso la segnalazione degli assoni che si trovano nella materia bianca. Essendo presente in tutto il sistema nervoso centrale, essa permette agli individui di controllare il movimento, la memoria e le emozioni. [8]

1.3 Corteccia cerebrale

La superficie del telencefalo, la corteccia cerebrale, definita anche mantello o pallium, ha un aspetto irregolarmente pieghettato, caratterizzato da solchi o scissure che delimitano rilievi definiti giri o circonvoluzioni. Alcuni solchi, più profondi degli altri, detti solchi primari, consentono di identificare sulla corteccia sei lobi cerebrali (Figura 6): frontale, parietale, temporale, insulare o insula, occipitale e limbico. I lobi frontale, temporale, parietale e occipitale sono visibili sulla superficie cerebrale; l'insula è nascosta sotto la scissura di Silvio. Il lobo limbico (sistema limbico) è un'area a forma di C sul margine più mediale di ciascun emisfero cerebrale; comprende alcune parti dei lobi adiacenti.

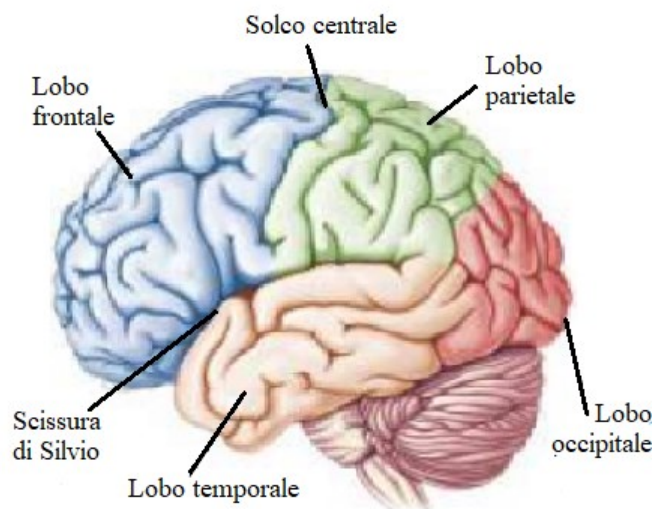


Figura 6: lobi del cervello umano (modificata da [5]).

1.3.1 Suddivisione anatomica

Strutturalmente, la corteccia cerebrale è caratterizzata da un'organizzazione laminare dei vari citotipi neuronali.

Il tessuto cerebrale è costituito da tre tipi di cellule: le cellule granulari, le cellule fusiformi e le cellule piramidali, riportate in Figura 7. Le prime svolgono principalmente la funzione di interneuroni corticali poiché hanno dimensioni medio-piccole e assoni brevi, e trasmettono i loro segnali a breve distanza. Possono essere eccitatorie o inibitorie, sintetizzando e rilasciando a livello sinaptico glutammato o acido γ -aminobutirrico (GABA) rispettivamente. Queste cellule sono presenti in numero elevato nelle aree sensoriali e associative della corteccia cerebrale, suggerendo una maggiore elaborazione dei segnali sensoriali in queste regioni. Le cellule piramidali e fusiformi invece sono le

principali cellule di origine delle proiezioni efferenti corticali. Le cellule piramidali, più grandi e numerose, danno origine alle fibre di grosso calibro che raggiungono il midollo spinale e alle fibre commissurali che permettono l'innervazione tra le aree corticali dei due emisferi.

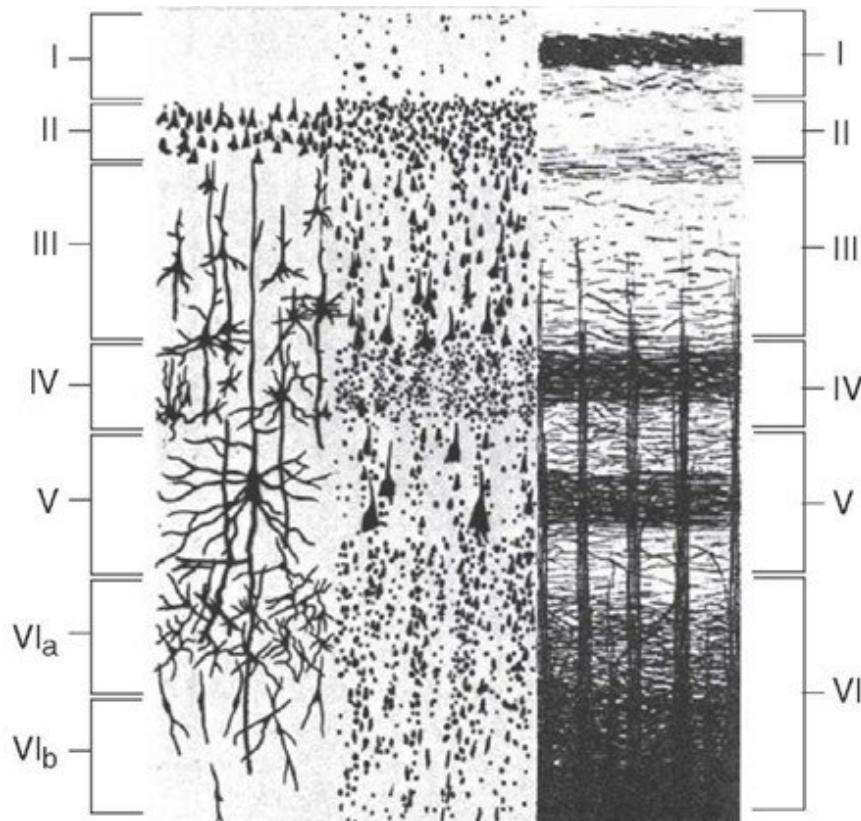


Figura 7: Struttura della corteccia cerebrale: I strato molecolare, II strato granulare esterno, III strato esterno delle cellule piramidali, IV strato granulare interno, V strato interno delle grandi cellule piramidali, VI strato delle cellule fusiforme o polimorfe [2].

Nella parte destra della Figura 7 viene mostrata l'organizzazione tipica delle fibre nei sei strati della corteccia cerebrale. Da un lato, ci sono le fibre orizzontali che si estendono tra le aree corticali adiacenti e delineano i vari strati corticali. Queste fibre orizzontali contribuiscono alla connettività locale all'interno della corteccia cerebrale. Dall'altro lato, ci sono le colonne cellulari delimitate dalle fibre verticali. Queste fibre verticali attraversano la corteccia cerebrale, connettendo le diverse aree corticali con le strutture sottocorticali. Le fibre verticali fungono da vie di ingresso e uscita per la corteccia cerebrale, trasmettendo segnali tra la corteccia e le regioni sottocorticali come il talamo, il tronco encefalico e il midollo spinale. [9] La maggior parte dei segnali sensoriali specifici che raggiungono la corteccia cerebrale termina nello strato IV, mentre la maggior parte dei segnali in

uscita lascia la corteccia cerebrale attraverso i neuroni situati negli strati V e VI. Dallo strato V della corteccia cerebrale originano la maggior parte delle fibre mielinizzate di grosso calibro che si dirigono verso il tronco encefalico e il midollo spinale, mentre dallo strato VI emergono numerose fibre dirette al talamo. I neuroni e le fibre degli strati I, II e III della corteccia cerebrale sono interconnessi e sono coinvolti nei processi di elaborazione dei segnali provenienti da diverse aree corticali, formando il substrato neurale alla base dei compiti di associazione. Gli strati II e III della corteccia cerebrale ospitano un elevato numero di neuroni che stabiliscono connessioni brevi con i neuroni delle aree corticali adiacenti.

1.3.2 Suddivisione funzionale delle aree cerebrali

Le aree della corteccia cerebrale sono distinte, sotto l'aspetto funzionale, in aree sensitive, aree motorie e aree associative (Figura 8).

Le aree sensitive sono le aree della corteccia cerebrale alle quali arrivano le grandi vie nervose sensitive che hanno origine dai recettori delle cinque modalità sensoriali. Per ciascuna modalità sensoriale si devono distinguere aree primarie, secondarie, e talvolta terziarie in rapporto con il grado di prossimità funzionale rispetto alla periferia sensoriale. In altri termini, le aree primarie sono quelle che ricevono le afferenze direttamente dal talamo, e per ciascuna modalità, effettuano una prima elaborazione delle informazioni per ritrasmetterle poi alle aree secondarie e terziarie, dove avverrà un'ulteriore elaborazione delle informazioni. Se si considera come esempio di modalità la sensibilità somatica generale, l'area somestesica primaria analizza distintamente la sub-modalità cutanea (superficiale e profonda) e quella muscolo-articolare e le ritrasmette alle aree secondarie e terziarie dove le sub-modalità si integrano, vengono rielaborate e, quindi, ritrasmesse alle aree associative. Per tale motivo, le aree sensitive primarie sono definite aree unimodali, mentre le aree sensitive secondarie e terziarie sono definite aree unimodali di ordine superiore o aree associative unimodali.

Anche per le aree cerebrali che organizzano e gestiscono l'atto motorio, ossia le aree motorie o motrici, vale la stessa divisione in primarie, secondarie e terziarie, e l'area motoria primaria è la più prossima alla periferia, ovvero è quella in diretta connessione con i motoneuroni del tronco encefalico e del midollo spinale. Tuttavia, mentre le aree sensitive primarie sono la sede iniziale di analisi delle informazioni sensitive, l'area motoria primaria è la sede finale di messa in opera dei programmi motori elaborati nelle aree motorie di ordine superiore poste rostralmente ad essa. In altre parole, mentre nelle aree sensitive il flusso di informazione viaggia dalle aree primarie alle aree di ordine

superiore, nel compartimento motorio le informazioni fluiscono dall'area di ordine superiore all'area motoria primaria.

Le aree associative sono aree corticali che integrano le informazioni che provengono da numerose aree corticali diverse, rappresentano l'apice gerarchico del sistema analitico corticale e sono, pertanto, definite aree associative multimodali o aree delle funzioni cognitive superiori. Queste aree multimodali sono particolarmente importanti perché generano percezioni globali unificate, corredandole con le emozioni, e risposte motorie appropriate. Le aree associative multimodali sono tre: l'area associativa posteriore, localizzata tra il lobo parietale, il lobo occipitale e il lobo temporale, integra le informazioni somatosensitive, visive e acustiche finalizzandole alle percezioni e al linguaggio; l'area associativa limbica, localizzata sulla faccia mediale degli emisferi cerebrali intorno al CC, presiede al comportamento emozionale e alla memoria episodica; l'area associativa anteriore o corteccia prefrontale, localizzata al davanti delle aree motorie, presiede all'elaborazione delle strategie motorie. [2]

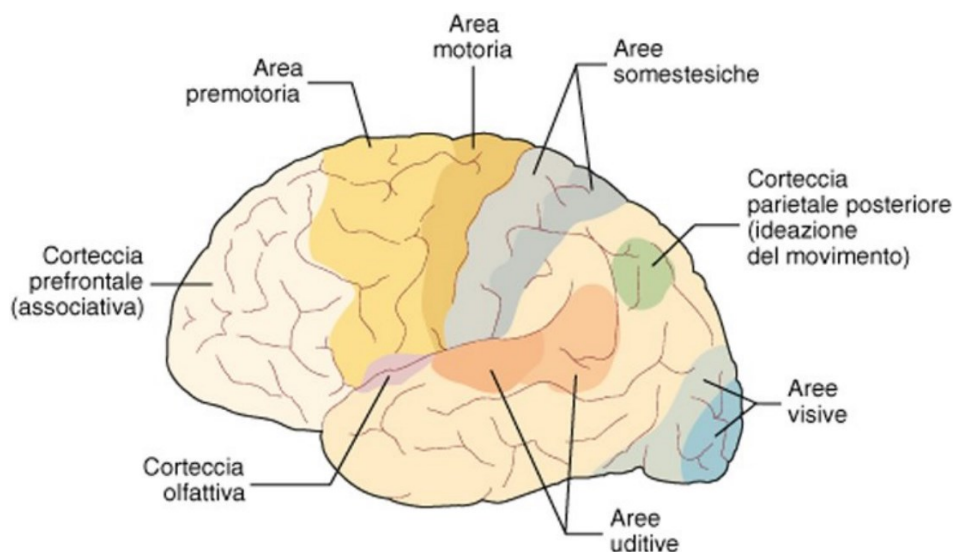


Figura 8: Suddivisione anatomo-funzionale dell'emisfero cerebrale, visione laterale [2].

1.3.3 Aree di Brodmann

All'inizio del XX secolo, il neurologo tedesco Korbinian Brodmann, si dedicò alla ricerca in campo neurologico e psichiatrico. Egli costruì una mappa citoarchitettonica della corteccia umana, illustrata nella Figura 9, la quale rappresenta quella porzione di corteccia cerebrale con sviluppo filogenetico più recente occupante circa il 90% della superficie cerebrale.

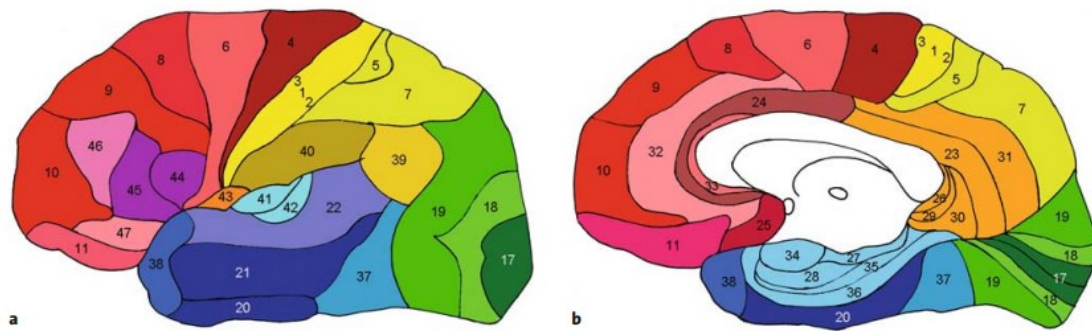


Figura 9: Rappresentazione del cervello secondo la suddivisione in aree di Brodmann. Superficie laterale (a) e mediale (b) [10].

La teoria di Brodmann, basata sulla suddivisione della corteccia in aree possedenti cellule simili e struttura laminare, fu realizzata grazie al metodo di colorazione di Nissl. Nissl introdusse una colorazione istologica con la quale era possibile una visione selettiva del soma neuronale, impiegando anilina basica per colorare l'RNA e per mettere in evidenza le caratteristiche strutturali dei neuroni. Utilizzando un microscopio ottico fu possibile osservare e classificare l'organizzazione neuronale della corteccia. Brodmann definì 52 aree alle quali venne assegnato a ciascuna un numero. Ciò che Brodmann intuì, ma non poté dimostrare, è che aree corticali aventi aspetto differente sottendono funzioni differenti. La mappa di Brodmann è tutt'oggi adoperata sia per scopi clinico-diagnostici che scientifici, nonostante nel tempo sia stata ampiamente dibattuta e raffinata, ed alcuni ricercatori ne abbiano proposto un modello da 200 aree. [10]

1.4 Lateralizzazione emisferica

Il cervello umano, organo pari e simmetrico, presenta sottili asimmetrie tra le sue due metà. Queste differenze strutturali hanno correlati funzionali estremamente importanti, dato che il cervello è la sede delle funzioni superiori e responsabile del comportamento. I due emisferi cerebrali funzionano come un'unità, infatti ricopre un ruolo particolarmente importante la struttura che li connette, cioè il CC: la sua regolare attività permette l'unificazione funzionale dei due lati, la sua assenza consente di studiare separatamente le rispettive specializzazioni emisferiche.

Le asimmetrie cerebrali si possono considerare un caso particolare del più generale aspetto della localizzazione di funzioni nel sistema nervoso. In base a quanto detto finora, è possibile affermare che singole componenti di una data attività sono legate a specifici substrati nervosi, in modo evidente quanto più semplici sono le attività, un po' meno quando sono più complesse. Le diverse forme di localizzazione rispondono alla ragione generale di economizzare le connessioni nell'ambito del sistema nervoso, separando i substrati di singole componenti di una data attività con l'obiettivo di aumentarne l'efficienza. Grazie alle descrizioni di casi clinici di perdita del linguaggio per lesioni di porzioni diverse dell'emisfero sinistro, s'iniziò a formulare l'idea di una localizzazione certa e sicuramente asimmetrica di funzioni cerebrali; anzi, l'asimmetria funzionale per il linguaggio fu considerata come dominanza assoluta di un emisfero sull'altro: nella maggior parte dei casi, dell'emisfero sinistro sul destro. Un altro notevole stimolo allo studio delle asimmetrie è stato dato dall'osservazione dei cosiddetti pazienti dal cervello diviso (split-brain) a partire dall'inizio degli anni Sessanta del secolo scorso. Si tratta di pazienti in cui la principale via di comunicazione tra i due emisferi, il CC, è stata interrotta chirurgicamente allo scopo di ridurre la diffusione dell'attività epilettica, ma con il risultato aggiuntivo di separare strutturalmente e funzionalmente i due emisferi. L'osservazione di questi casi ha confermato che la dominanza dell'emisfero sinistro non è assoluta, ma relativa, per cui ci sono funzioni nelle quali prevale l'emisfero destro. Contemporaneamente, hanno cominciato ad essere svolti studi su soggetti sani, che hanno rafforzato quest'ultima teoria di funzioni distribuite asimmetricamente tra i due emisferi. A questo punto, si è consolidata l'osservazione di differenze strutturali tra i due lati del cervello. Un aspetto rilevante delle asimmetrie morfo-funzionali è il fatto che esse vanno nella stessa direzione nella grande maggioranza della popolazione e questo fenomeno è chiamato lateralizzazione di popolazione. Recenti studi etologici, hanno dimostrato che in varie specie, comportamenti come l'attacco e la difesa sono nettamente lateralizzati a livello di specie. Questo si traduce in un vantaggio in termini di sopravvivenza: lo svantaggio legato alla prevedibilità del comportamento sarebbe superato dal vantaggio "sociale" (coesione del gruppo).

1.5 Connessioni e disconnessioni tra emisferi

Per tutte le interazioni tra le due metà del cervello, al di là delle asimmetrie di ciascuna, è cruciale l'integrità delle formazioni commessurali interemisferiche, tra cui il CC spicca per dimensioni e importanza funzionale. Il CC unisce i due emisferi cerebrali creando due tipi di connessioni:

- connessioni callosali omotopiche, tra porzioni corrispondenti della corteccia dei due lati;
- connessioni callosali eterotopiche, tra aree cerebrali diverse ma legate da una certa omogeneità funzionale.

Secondo il principio della complementarità supplementare di R.W. Sperry [11], le connessioni callosali servono ad assicurare la continuità anatomica e funzionale tra le mappe sensitive e motorie controlaterali che si formano in ogni metà del cervello: l'area di un lato aggiunge a quella dell'altro un supplemento di informazioni diverse e tali da renderla complementare. Accanto all'interpretazione di Sperry, è importante citare quella secondo cui, almeno in certe circostanze, il CC abbia la funzione di mettere in competizione un'area con quella di solito omotopica controlaterale, mediante un effetto inibitorio.

Se il CC è intatto, le informazioni degli organi di senso, inizialmente dirette a un emisfero cerebrale, vengono messe a disposizione dell'altro emisfero nell'ambito di pochissimi millisecondi. In caso contrario, l'integrazione richiede tempi più lunghi o potrebbe diventare del tutto impossibile. [12]

Capitolo 2 Neuroimaging: Risonanza Magnetica Funzionale

2.1 Neuroimaging

Lo sviluppo del neuroimaging, inteso secondo definizione enciclopedica come “insieme di strumenti tecnologici e procedure sperimentali per la visualizzazione del cervello dell'uomo in vivo” [13], sia nei suoi dettagli anatomici e strutturali (neuroimaging morfologico) sia nel corso di esecuzione di particolari compiti motori e cognitivi (neuroimaging funzionale), ha consentito, nell'ultimo ventennio di dare un grande contributo alla conoscenza della neuroanatomia funzionale. Tali tecnologie dovrebbero idealmente produrre una tempistica accurata (nel caso dell'imaging funzionale) e una localizzazione spaziale (per l'imaging strutturale e funzionale) della funzione cerebrale, della struttura o dei cambiamenti in queste caratteristiche del cervello. Il metodo deve essere minimamente invasivo e ripetibile (per facilitare l'uso nel monitoraggio del trattamento e lo sviluppo di strategie terapeutiche). L'attuale risonanza magnetica strutturale (Magnetic Resonance Imaging, MRI) ha una buona risoluzione spaziale, non è invasiva e soddisfa i criteri di cui sopra per l'analisi strutturale. Al contrario, nessuna tecnica attualmente esistente soddisfa tutti questi criteri nel caso dell'imaging funzionale, ma i metodi più comuni e ampiamente utilizzati sono l'elettroencefalografia (EEG), che rappresenta l'approccio più vicino alla misurazione diretta dell'attività neuronale (ma ha proprietà di mappatura spaziale piuttosto scarse), la tomografia a emissione di positroni (PET) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI). Il neuroimaging funzionale non iniziò con la fMRI, che ha raggiunto la sua fama solo negli ultimi decenni. Prima di allora, la tecnica di neuroimaging funzionale più utilizzata era la tomografia a emissione di positroni (PET), che si basa sull'iniezione di traccianti radioattivi per misurare i cambiamenti nel cervello, tra cui il flusso sanguigno e/o il metabolismo del glucosio. Utilizzando la PET, i ricercatori potevano identificare le parti del cervello associate metabolicamente a una determinata funzione percettiva, motoria o cognitiva, come vedere i volti, muovere la mano destra o recitare mentalmente delle frasi. Tuttavia, l'imaging PET soffre di diversi svantaggi, tra cui l'invasività delle iniezioni radioattive, il costo della generazione degli isotopi radioattivi e la lentezza con cui vengono acquisite le immagini. [14]

2.2 Risonanza Magnetica Nucleare

Con il termine Risonanza Magnetica Nucleare si intende l'assorbimento di onde radio ad altissima frequenza da parte di alcuni nuclei atomici sottoposti a un campo magnetico stazionario adeguatamente forte. Questo fenomeno fu osservato per la prima volta nel 1946 dai fisici Felix Bloch [15] e Edward M. Purcell [16]. All'inizio degli anni '80 le tecniche di NMR iniziarono ad essere utilizzate in medicina per visualizzare i tessuti molli del corpo. Questa applicazione della NMR, chiamata MRI, presentava un modo non invasivo e privo di rischi per generare immagini visive di fette sottili del corpo. Le immagini NMR mostrano una grande sensibilità nel differenziare i tessuti normali da quelli malati o danneggiati. Alla fine degli anni '80 la risonanza magnetica (RM) si è dimostrata superiore alla maggior parte delle altre tecniche di imaging nel fornire immagini di cervello, cuore, fegato, reni, milza, pancreas, seno e altri organi. La RM fornisce immagini a contrasto relativamente elevato e di tonalità variabile che possono mostrare tumori, tessuti danneggiati e placche neurali dovute alla sclerosi multipla. La tecnica non presenta rischi noti per la salute, ma non può essere utilizzata su persone che hanno pacemaker cardiaci o altri dispositivi contenenti metalli impiantati nel corpo. [17]

Lo scopo della RM è quello di ottenere immagini anatomiche dettagliate sfruttando alcune proprietà nucleari degli atomi in presenza di campi magnetici. Questa tecnica misura, infatti, la risposta di un nucleo atomico dopo l'applicazione di un campo magnetico esterno. Tale fenomeno può essere studiato utilizzando diversi tipi di nuclei (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P), ma nel MRI standard, viene utilizzato l'atomo di idrogeno ^1H , il più abbondante degli elementi nel corpo umano. Nel normale uso clinico, il segnale MRI proviene quasi totalmente dai protoni dell'acqua contenuti nei tessuti. L'intensità dell'immagine dipende principalmente dalla densità protonica, ma può essere fortemente influenzata dall'ambiente in cui si trovano le molecole d'acqua. La RM è una tecnica di indagine sulla materia basata sulla misura della precessione dello spin di protoni o di altri nuclei dotati di momento magnetico ($\vec{\mu}$) quando sono sottoposti ad un campo magnetico (B_0). Lo spin del nucleo atomico può essere descritto come un momento magnetico rappresentato da un vettore $\vec{\mu}$.

Quando un nucleo atomico interagisce con un campo magnetico uniforme e costante rappresentato dal vettore $\vec{B}_0$, tende ad orientarsi nella direzione del campo magnetico (Figura 10b), risentendo di una coppia data da $\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0$, che provoca la rotazione (precessione) di $\vec{\mu}$ attorno alla direzione delle linee di forza del campo magnetico B_0 con una ben precisa frequenza angolare ω_0 , detta frequenza di Larmor, che dipende esclusivamente dal tipo di nucleo e dalla intensità del campo magnetico B_0 (Figura 10c).

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (1)$$

L'equazione di Larmor (1) esprime la relazione tra la forza del campo magnetico B_0 e la frequenza di precessione dei protoni ω_0 ; γ è la costante giromagnetica, dipendente dal tipo di nucleo: per l'idrogeno il suo valore è 42,57 MHz/T.

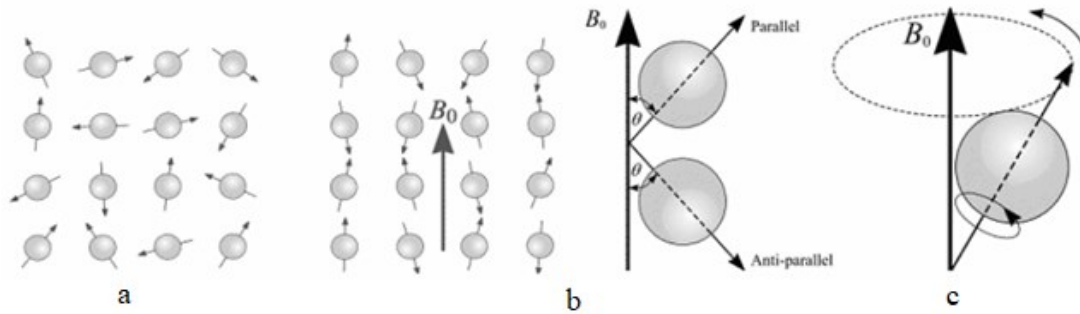


Figura 10: a) In assenza di campo magnetico B_0 lo spin dei protoni ha l'asse disposto casualmente nello spazio; b) In presenza di un campo magnetico B_0 i protoni si allineano lungo la direzione del campo, con verso parallelo o antiparallelo a quello del campo; c) Gli atomi precessano attorno all'asse del campo magnetico B_0 alla frequenza di Larmor (ω_0) descrivendo la forma di un cono.

Nella RM non si osserva un singolo nucleo, ma viene statisticamente misurato l'effetto complessivo di una popolazione di nuclei presenti entro il campione di materiale sotto esame. Viene quindi definito un vettore di magnetizzazione $\vec{M}$ come la risultante della somma vettoriale di tutti i momenti magnetici dei singoli nuclei, ciascuno dei quali potrà avere la componente parallela a $\vec{B}_0$, con lo stesso verso di $\vec{B}_0$ (allineamento parallelo), oppure con verso opposto (allineamento antiparallelo). In base alle leggi della meccanica quantistica si ha un leggero eccesso di momenti magnetici allineati in un verso rispetto all'altro, e quindi il vettore risultante $\vec{M}_0$ non è nullo e perciò misurabile. La popolazione di nuclei con spin parallelo N_1 , orientata secondo il verso di $\vec{B}_0$, possiede energia potenziale minore E_1 e si trova in soprannumero rispetto alla popolazione N_2 con spin antiparallelo e con energia potenziale maggiore E_2 . La distribuzione della popolazione nei due livelli energetici E_1 ed E_2 è data dalla legge di distribuzione di Boltzmann (2):

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (2)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, T è la temperatura espressa in Kelvin e $\Delta E = E_2 - E_1$ è la differenza di energia tra i due livelli. Quindi il vettore M , risultante dall'azione del campo magnetico sugli spin nucleari, ha ampiezza uguale a quella dell'eccesso di spin (popolazione N_1) definito dal modello quantistico e direzione e verso uguali a quelle del campo esterno B_0 applicato. In definitiva, è possibile ottenere da un piccolo volume di materia un vettore magnetizzazione misurabile dato dalla composizione dei vettori (non misurabili) μ dovuti agli spin dei nuclei contenuti nella materia. Per poter rilevare questo vettore M occorre perturbare il sistema dal suo stato di equilibrio, ad esempio applicando un secondo campo magnetico B_1 perpendicolare a B_0 e variabile nel tempo. B_1 può essere indotto per mezzo di un segnale a radiofrequenze (RF). Se B_1 ruota intorno a B_0 con frequenza uguale a ω_0 , cambiando il sistema di riferimento e ponendosi solidali con B_1 , si osserva il vettore M precessare attorno a B_1 con frequenza angolare ω_1 , variando in questo sistema di riferimento il proprio orientamento rispetto alla direzione del campo B_0 . I campi B_0 e B_1 sono detti rispettivamente campo di polarizzazione e campo di eccitazione. La rotazione che il vettore M subisce rispetto al campo principale per effetto del campo B_1 dipende dall'energia assorbita dai nuclei e quindi anche dal tempo di applicazione τ di B_1 stesso. L'angolo di rotazione è detto angolo di flip (Flip Angle) e la sua variazione è illustrata in Figura 11. [18]

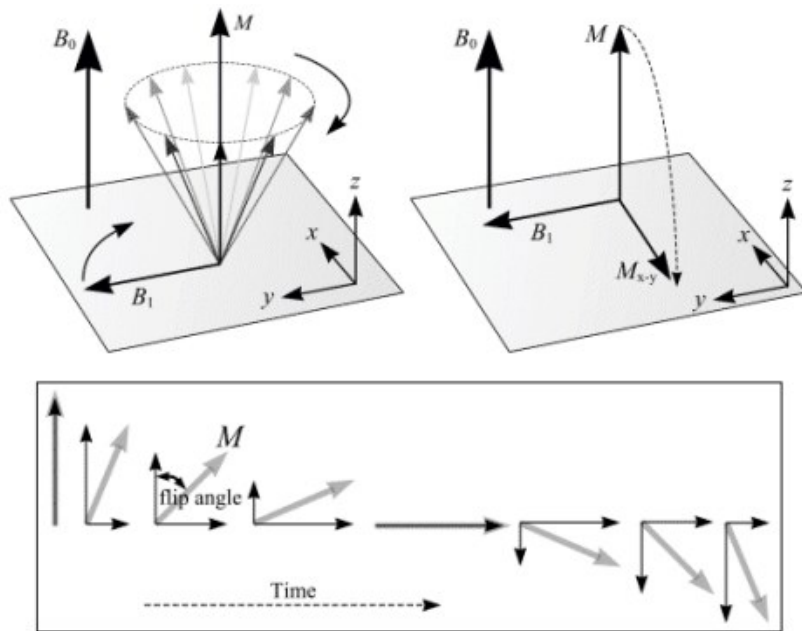


Figura 11: La magnetizzazione netta M è cambiata dalla applicazione di un impulso RF alla frequenza di Larmor ω_0 ; il grado di rotazione dell'asse M è detto Flip Angle ed è determinato dalla forza e dalla durata dell'impulso RF. Un impulso a 90° sposta la direzione di M dal piano longitudinale z al piano trasversale xy .

La manipolazione del vettore di magnetizzazione M tramite l'applicazione di un campo magnetico B_1 e il tempo τ può portare a rotazioni specifiche. Ad esempio, è possibile ruotare il vettore M di 90° utilizzando un impulso di 90° , o invertire la direzione del vettore M utilizzando un impulso di 180° , noto anche come impulso di inversione o impulso π (Figura 11).

Durante un impulso di inversione, una parte dei nuclei nella popolazione N_1 acquisisce energia sufficiente per invertire la direzione dei loro momenti magnetici μ , in modo che il numero di nuclei con μ antiparalleli eguagli il numero di nuclei con μ paralleli ($N_1 = N_2$). Tuttavia, affinché ciò avvenga, secondo la legge di Boltzmann, la temperatura del sistema di spin dovrebbe essere infinita, il che significa che il sistema di spin non è più in equilibrio termico con l'ambiente circostante (reticolo). Pertanto, una volta spento il campo magnetico B_1 , il sistema di spin cederà l'eccesso di energia al reticolo. Dopo la perturbazione causata dal campo B_1 , si ripristina l'equilibrio iniziale tra gli spin degli atomi nel campione e il campo B_0 con determinate modalità temporali. Durante questo processo di rilassamento, l'ampiezza del vettore M non viene conservata. Il processo di rilassamento coinvolge due fenomeni: il rilassamento trasversale, che comporta l'annullamento della componente trasversale M_{xy} , e il rilassamento longitudinale, che riguarda il recupero della magnetizzazione longitudinale M_z . L'evoluzione delle componenti del vettore $M(t)$ viene descritta dalle equazioni di Bloch nel sistema di riferimento rotante. I tempi di rilassamento sono grandezze variabili che possono essere espressi in termini di due costanti:

- La costante di tempo T_1 , che governa il ritorno all'equilibrio della componente longitudinale del vettore M , è chiamata tempo di rilassamento spin-reticolo in quanto coinvolge il trasferimento di energia tra il sistema di spin e l'ambiente circostante (reticolo).
- La costante di tempo T_2 , che rappresenta l'annullamento della componente trasversale del vettore M , è chiamata tempo di rilassamento spin-spin in quanto coinvolge le interazioni tra i momenti magnetici dei singoli nuclei.

Sono due i fattori che contribuiscono al decadimento della magnetizzazione trasversale:

- 1) interazioni molecolari (che portano ad un effetto molecolare detto T_2 puro)
- 2) variazioni del campo magnetico statico B_0 (che portano ad un effetto detto T_2 di disomogeneità di campo).

La combinazione di questi due fattori è quella che realmente si verifica nel decadimento della magnetizzazione trasversale. La costante di tempo "combinata" è chiamata T_2^* ed è contraddistinta dal simbolo T_2^* . Il tempo di rilassamento T_2 è sempre minore o uguale a T_1 . [18]

Una volta terminata l'applicazione del campo B_1 , dopo un tempo di applicazione T_p , si osserva il ritorno della magnetizzazione macroscopica M verso l'equilibrio, allineandosi nuovamente con il campo magnetico B_0 . Questo processo di riallineamento può essere misurato in laboratorio utilizzando una bobina ad induzione elettromagnetica posizionata intorno al campione in direzione ortogonale al campo magnetico esterno. La bobina funziona come un'antenna e rileva le variazioni della componente trasversale del vettore M , inducendo una piccola forza elettromotrice nella bobina stessa. Questa forza elettromotrice, misurabile attraverso un ricevitore a radiofrequenze, produce il segnale RMN noto come FID (Free Induction Decay) o decadimento libero dell'induzione. Il segnale FID oscilla alla frequenza di Larmor e si attenua nel tempo in modo esponenziale (Figura 12).

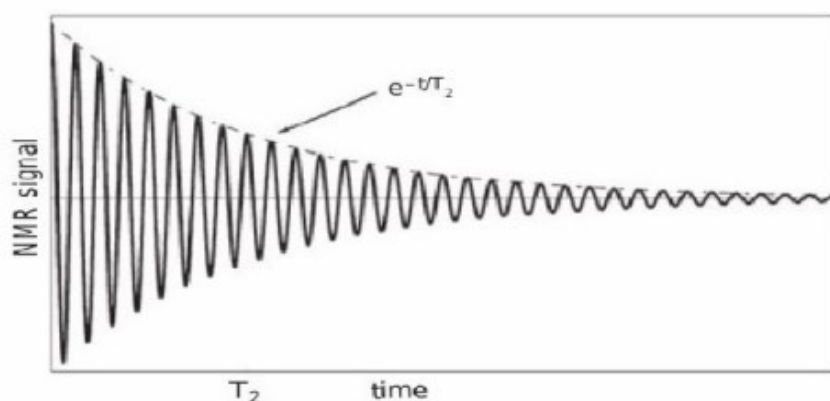


Figura 12: Rilassamento della componente trasversale del vettore M in funzione del tempo. La curva ha andamento esponenziale negativo [18].

2.2.1 Generazione delle immagini

L'Imaging RM (MRI) si basa su tre metodi per generare le immagini:

- Codifica della sezione o slice encoding
- Codifica della frequenza o frequency encoding
- Codifica di fase o phase encoding

L'intensità del segnale in ogni posizione dipende dalla densità di protoni in quella specifica area.

Codifica della sezione

Come precedentemente menzionato, quando si applica un campo magnetico esterno, gli spin dei protoni si allineano con la direzione di questo campo. In una eccitazione non selettiva, l'impulso RF fa allineare tutti gli spin nel piano trasversale. Tuttavia, in una eccitazione selettiva per sezione, si applica inizialmente un gradiente (un impulso RF) lungo l'asse longitudinale (z), che crea un campo magnetico di intensità variabile per i protoni, dipendente dalla loro posizione lungo tale gradiente RF. L'impulso RF eccita solo i protoni che si trovano a una distanza costante dalla bobina e hanno una frequenza di Larmor uguale alla frequenza dell'impulso. In questo modo, si seleziona una sezione (slice) a una distanza specifica dalla bobina; variando la frequenza dell'impulso RF, si copre l'intero intervallo delle frequenze di precessione del volume desiderato. Pertanto, il volume sarà diviso in fette prese in tutte le direzioni: trasversali, sagittali e oblique. Variando l'intensità dell'impulso RF, è possibile selezionare spessori di sezione diversi.

Codifica della frequenza

La codifica della frequenza è il processo che determina la posizione spaziale dell'impulso sull'asse x. Si applica un gradiente spaziale lineare B_x al campo magnetico B_0 esistente, che porta a frequenze di Larmor diverse gli spin in diverse posizioni lungo l'asse x. Il segnale rilevato è la somma delle diverse frequenze. Attraverso la trasformata di Fourier, è possibile ottenere dal segnale in funzione del tempo un segnale in funzione delle frequenze (Figura 13); poiché la frequenza varia con la posizione sull'asse x, è possibile ricavare la posizione dell'impulso sull'asse x dal segnale. Il gradiente utilizzato per la codifica della frequenza è chiamato gradiente di lettura (read-out gradient).

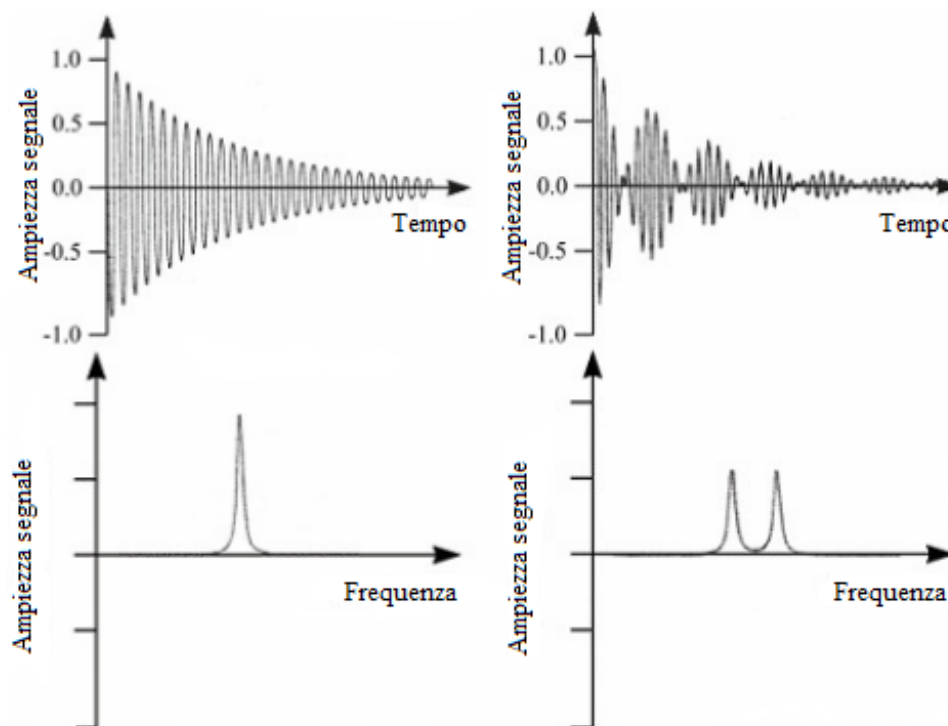


Figura 13: Esempi di segnali ottenuti nella codifica della frequenza. La trasformata di Fourier permette di ottenere il segnale in funzione della frequenza, da cui si ricava la posizione del segnale sull'asse x (modificata).

Codifica di fase

Analogamente ai gradienti applicati per la localizzazione dell'immagine, durante la codifica di fase si applica un gradiente lungo l'asse y. Quando questo gradiente viene rimosso, i protoni tornano alla stessa frequenza, ma sono sfasati l'uno rispetto all'altro. Il gradiente G_y viene applicato subito dopo l'impulso RF o prima del gradiente G_x . In questo modo, lo sfasamento indotto da G_y consente di differenziare le diverse aree di una sezione quando successivamente viene applicato G_x ; ciò determina le posizioni lungo gli assi x e y in base alle frequenze.

k-spazio

Una volta estratte dal segnale RM tutte le frequenze relative alle varie posizioni lungo gli assi x e y, si ottiene uno spazio chiamato k-spazio, che rappresenta in due dimensioni le frequenze e quindi le posizioni dei protoni nella sezione considerata. Il segnale trasmesso in ogni singolo Tempo di Ripetizione (TR) riempie una porzione del k-spazio. TR è l'intervallo di tempo tra un impulso RF a

90° e il successivo, mentre il tempo di eco (TE) è l'intervallo di tempo tra l'impulso RF e il picco del segnale (Figura 14).

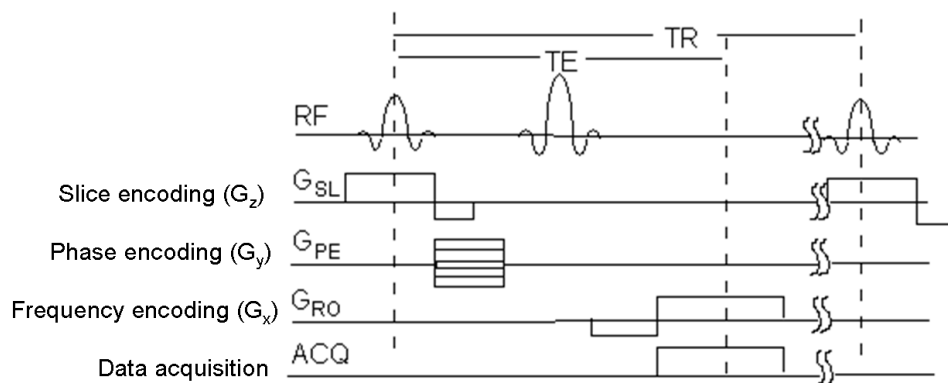


Figura 14: Impulso RF. L'applicazione ripetuta di questi gradienti porta alla completa raccolta dei dati che formeranno l'immagine.

Il k-spazio contiene una versione digitalizzata dell'immagine ottenuta tramite la tecnica chiamata Conversione Analogico-Digitale (ADC). Una volta che il k-spazio è completamente campionato, è possibile ottenere la vera immagine anatomica mediante la trasformata di Fourier (Figura 15). L'antitrasformazione del segnale consente di ottenere la distribuzione della densità dei protoni. La parte centrale del k-spazio (basse frequenze) determina il contrasto dell'immagine, mentre le parti esterne (alte frequenze) influenzano i dettagli dell'immagine. [18]

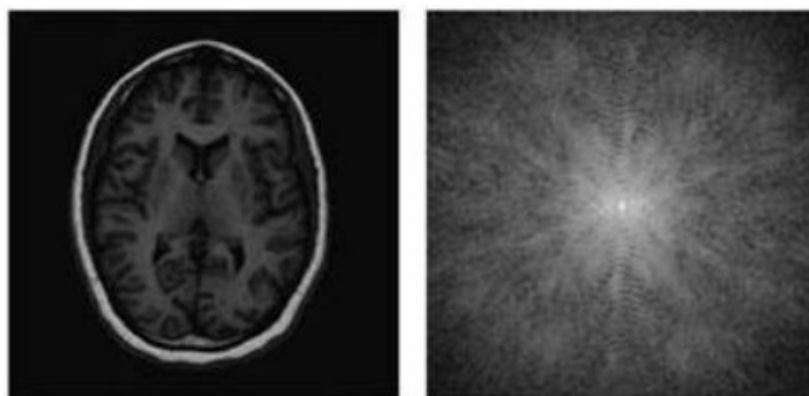


Fig. 15: Immagine e k-spazio. I dati provenienti dallo scanner sono dati di k-spazio. I dati dell'immagine sono ottenuti attraverso la trasformata di Fourier a partire dai dati del k-spazio.

2.2.2 Modalità di acquisizione delle immagini

Immagini 2D

La modalità 2D acquisisce e ricostruisce i dati dell'immagine grezza (Raw Data) in immagini bidimensionali (sezioni o slices), in cui la luminosità è proporzionale all'intensità del segnale RM proveniente dai protoni corrispondenti. Questo metodo di eccitazione selettiva per sezioni è seguito dalla codifica di sequenza e di fase, che produce un'immagine con una rappresentazione spaziale bidimensionale, una lungo l'asse di fase e l'altra lungo l'asse di frequenza. Pertanto, tale immagine è chiamata 2D ed è illustrata in Figura 16.

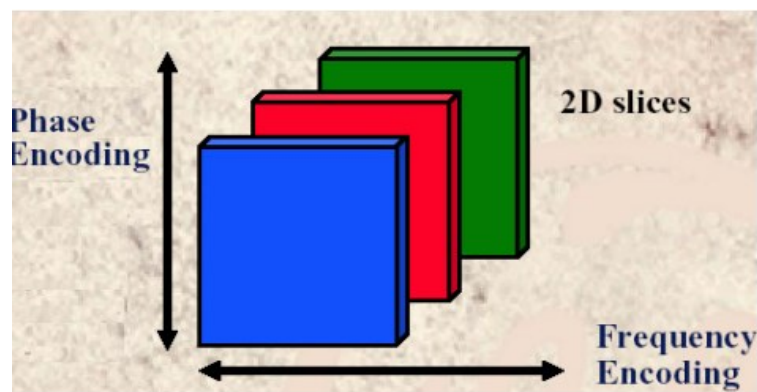


Figura 16: codifica bidimensionale.

L'acquisizione può essere condotta con due tecniche:

- Tecnica a sezione singola: le singole sezioni vengono acquisite in sequenza, iniziando l'acquisizione di una sezione solo dopo aver completato quella precedente. Questa modalità è utile quando sono necessari tempi di ripetizione (TR) molto brevi. (Figura 17a)
- Tecnica multiplanare: vengono acquisite più sezioni all'interno dello stesso TR. Per fare ciò, durante lo stesso tempo di eco (TE), vengono eccitate più sezioni utilizzando impulsi di frequenze leggermente diverse. Se il TR è sufficientemente lungo, possono essere eccitate più sezioni in modo intercalato (interleaved), seguite sempre dalla misurazione dell'eco risultante. Questa tecnica è utile per aumentare l'intensità del segnale dei tessuti con tempi di rilassamento T1 lunghi, poiché richiedono TR lunghi. [19]. (Figura 17b)

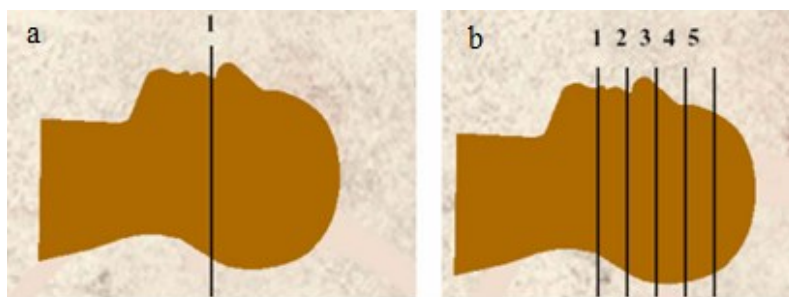


Figura 17: a) Acquisizione a sezione singola; b) Acquisizione multiplanare.

Immagini 3D

Nelle immagini 3D o di volume, è necessario un ampio impulso RF per eccitare un intero volume o slab (Figura 18b). La codifica spaziale viene eseguita lungo i tre assi: fase, frequenza e successivamente sezione (Figura 18a). Questa successiva codifica consente di avere i dati suddivisi in sezioni molto sottili, chiamate partizioni; i voxel ottenuti hanno la stessa dimensione lungo tutte e tre le dimensioni, e quindi si parla di voxel isotropici.

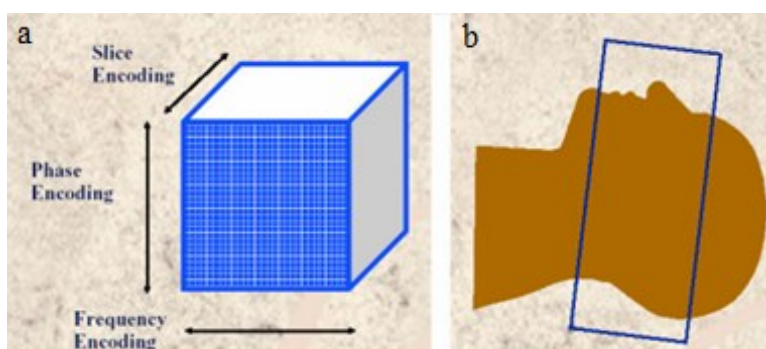


Fig. 18: a) Volume 3D; b) Slab 3D.

A causa della grande quantità di dati da elaborare, il tempo di acquisizione di una scansione tridimensionale è molto più lungo rispetto a quello di una scansione 2D. Per questo motivo, sono spesso utilizzate sequenze veloci come l'Echo Planar Imaging (EPI).

2.3 Risonanza Magnetica Funzionale

La fMRI è una classe di metodi di imaging sviluppati per dimostrare i cambiamenti regionali e variabili nel tempo dell'attività cerebrale, basandosi su variazioni del metabolismo. Tali variazioni possono essere conseguenti a cambiamenti dello stato cognitivo indotti dall'attività o il risultato di processi non regolati nel cervello a riposo. Sin dalle sue origini, nel 1990, la fMRI è stata utilizzata in un numero eccezionalmente elevato di studi nelle neuroscienze cognitive, psichiatria/psicologia clinica e pianificazione prechirurgica. La popolarità della fMRI deriva dalla sua ampia disponibilità (può essere eseguita su uno scanner clinico da 1,5 T), natura non invasiva (non richiede l'iniezione di un radioisotopo o altro agente farmacologico), costo relativamente basso e buona risoluzione spaziale. La fMRI viene sempre più utilizzata come biomarcatore per la malattia, per monitorare la terapia, o per lo studio dell'efficacia farmacologica. [20]

La fMRI si basa sulla MRI, che a sua volta utilizza la NMR accoppiata a gradienti di campo magnetico per creare immagini che possono incorporare molti tipi diversi di contrasto, come T1, T2, la suscettibilità, il flusso, ecc. A tal proposito, è importante ricordare che quando una regione della corteccia cerebrale entra in attività si verifica un aumento del flusso sanguigno e, quindi, un aumento di sangue ossigenato. In secondo luogo, è noto che l'apporto di ossiemoglobina è maggiore del consumo locale di ossigeno da parte dei neuroni presenti nell'area e che quindi si modifica il rapporto tra ossiemoglobina e desossiemoglobina.

2.3.1 Risposta emodinamica

Tutti i processi di segnalazione neurale nel cervello, tra cui la formazione e la propagazione dei potenziali d'azione, il legame delle vescicole alla giunzione pre-sinaptica, il rilascio di neurotrasmettitori, la ricezione e la rigenerazione dei potenziali d'azione nelle strutture postsinaptiche, la rimozione dei neurotrasmettitori in eccesso, ecc., richiedono energia sotto forma di adenosina trifosfato (ATP). Questo nucleotide è prodotto principalmente dai mitocondri e la sua formazione genera anidride carbonica come sottoprodotto. Quando una regione del cervello è attivata da un compito cognitivo o da uno stimolo, come ad esempio il tocco delle dita, l'attivazione neurale aggiuntiva e altri processi di segnalazione aumentano il fabbisogno energetico locale, determinando un aumento del tasso metabolico di ossigeno ($CMRO_2$) nella regione cerebrale interessata. Poiché le riserve locali di ossigeno nei tessuti adiacenti ai capillari vengono consumate transitoriamente e si accumulano prodotti di scarto, vari segnali chimici (CO_2 , NO , H^+) provocano una reazione vasomotoria negli sfinteri arteriolari a monte del letto capillare, causando la dilatazione di questi vasi.

L'aumento del flusso sanguigno agisce per ripristinare il livello locale di $[O_2]$ necessario per superare il deficit transitorio; tuttavia, per ragioni ancora non del tutto chiarite, viene erogato più ossigeno di quanto sia necessario per compensare l'aumento della $CMRO_2$. Di conseguenza, l'up-regulation neurale provoca inizialmente un accumulo di emoglobina deossigenata $[Hb]$ e una diminuzione dell'emoglobina ossigenata $[HbO_2]$ negli spazi intra ed extravascolari, seguita entro uno o due secondi da una risposta vasodilatatoria che inverte la situazione e determina un aumento della $[HbO_2]$ e una diminuzione della $[Hb]$ rispetto alla condizione di riposo. Questa sequenza di processi è descritta come risposta emodinamica all'evento neurale. Pertanto, le conseguenze principali dell'aumento dell'attività neurale sono due ed entrambe possono essere rilevate con la RM: l'aumento del flusso sanguigno cerebrale locale (CBF) e le variazioni della concentrazione di ossigenazione (contrasto dipendente dal livello di ossigeno nel sangue, o BOLD in Figura 19). La variazione del CBF può essere osservata con un agente di contrasto iniettato e con la RM ponderata per la perfusione, dimostrata per la prima volta da Belliveau o in modo non invasivo con l'arterial spin labeling (ASL). Tuttavia, l'ASL soffre di una sensibilità ridotta, di un maggiore tempo di acquisizione e di una maggiore sensibilità al movimento rispetto al metodo di contrasto BOLD, e il suo utilizzo si è quindi concentrato sull'ottenimento di misure quantitative del flusso sanguigno cerebrale (CBF) basale per studi di modellazione dei meccanismi neurobiologici di attivazione o di calibrazione della reattività vasale, piuttosto che nella mappatura di routine della funzione cerebrale. [20]

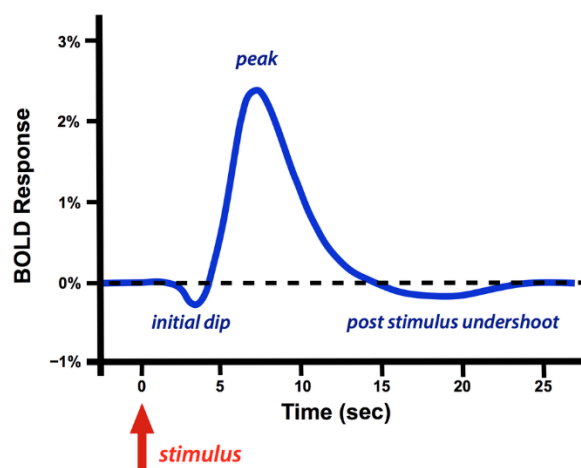


Figura 19: Funzione di risposta emodinamica (HRF) a seguito di un singolo breve stimolo.

2.3.2 Effetto Bold

I metodi di neuroimaging funzionale misurano le richieste metaboliche dei neuroni attivi, e non l'attività neuronale in sé. Come abbiamo visto l'energia è necessaria per il mantenimento e il ripristino dei potenziali di membrana neuronali fondamentali per l'integrazione e la segnalazione. Anche piccoli aumenti dell'attività neuronale possono comportare un forte aumento della domanda di energia locale. Le fonti energetiche principali sono il glucosio e l'ossigeno, che vengono utilizzati per creare ATP all'interno delle cellule cerebrali. L'ossigeno è legato alle molecole di emoglobina e viene scambiato con l'anidride carbonica di scarto nei capillari.

L'effetto BOLD (Blood Oxygen Level Dependent Effect) si riferisce ai cambiamenti nelle proprietà magnetiche a seconda delle condizioni del sangue. L'emoglobina, che è diamagnetica allo stato ossigenato [HbO_2], acquisisce la proprietà di paramagnetica dopo aver perso il legame con l'ossigeno [Hb]. Un materiale si dice diamagnetico se immerso in un campo magnetico B_0 non deforma significativamente le linee del campo, mentre un materiale è definito paramagnetico se si comporta come un dipolo in un campo magnetico, cioè si allinea in direzione del campo magnetico provocandone cambiamenti locali dell'intensità. La deformazione locale delle linee del campo magnetico porta alla perdita di segnale (susceptibilità magnetica) nelle immagini RM.

Il paramagnete, in questo caso l'emoglobina deossigenata, modificando la suscettibilità magnetica, fa variare il segnale di RM pesato $T2^*$, che aumenta al diminuire della deossigenazione. Tramite esperimenti su animali, è stato dimostrato che, con campi magnetici B_0 maggiori di 1,5 T, e immagini pesate $T2^*$ è possibile misurare un segnale dipendente dal livello di emoglobina deossigenata presente nella regione cerebrale, il cosiddetto segnale BOLD [21] che è, quindi, direttamente legato all'attivazione delle aree cerebrali. I cambiamenti del volume ematico osservati durante l'attività cerebrale in funzione dell'aumento del flusso sanguigno sono descritti dal balloon model [22]. L'aumento del flusso sanguigno in seguito all'attività neurale genera un maggiore flusso entrante di sangue nel sistema venoso rispetto a quello uscente, determinando un aumento del volume sanguigno. Nelle piccole vene l'aumento di volume iniziale è caratterizzato dalla presenza di emoglobina deossigenata, che viene eliminata per prima dai capillari. Tale aumento provoca un'iniziale diminuzione del segnale di risonanza (initial dip). Successivamente, l'aumento del segnale acquisito è dovuto ad un aumento sproporzionato del flusso sanguigno rispetto alle reali necessità, il che provoca un incremento locale della concentrazione di emoglobina e una relativa diminuzione della concentrazione di emoglobina deossigenata (overshoot). Il successivo undershoot è causato da uno sbilanciamento tra le velocità con cui il flusso e il volume ematico ritornano al valore basale. (Figure 19 e 20)

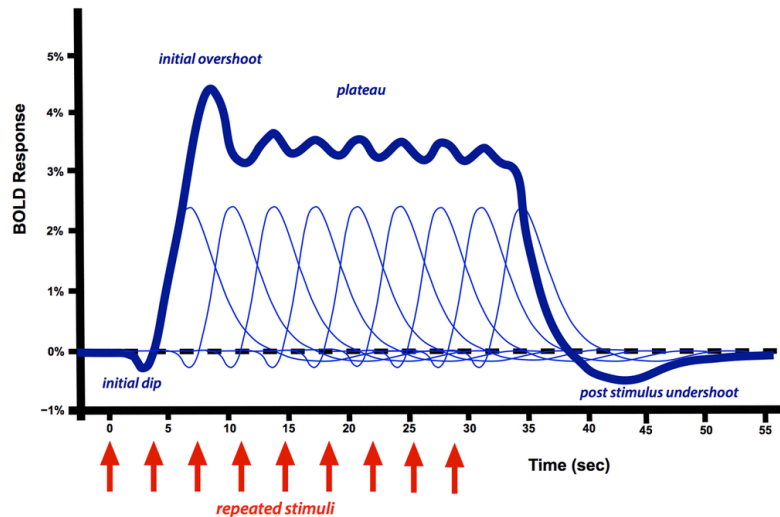


Figura 20: Quando viene applicato un lungo treno di stimoli ripetuti, il picco dominante diventa un ampio plateau, che non diminuisce fino al termine della stimolazione.

2.4 Risonanza Magnetica Funzionale in condizioni di Resting State

Negli ultimi anni si è posta maggiore attenzione alla tecnica di risonanza magnetica funzionale in resting state (rs-fMRI) in cui ai soggetti analizzati viene semplicemente chiesto di rimanere sdraiati con gli occhi aperti o chiusi, e di non addormentarsi; infatti, questa condizione prevede il completo rilassamento dell'attività neuronale, durante la quale le connessioni cerebrali non sono impegnate in alcuna funzione. Questa tecnica permette di individuare aree del cervello funzionalmente connesse senza che i soggetti debbano svolgere alcun compito, permettendo anche lo studio di soggetti con patologie neurologiche o neurodegenerative. Infatti, come dimostrato negli studi di Fox et al. [23] e Zhang et al. [24] il cervello è sempre attivo, anche in assenza di esecuzione di un compito specifico. Il cervello risulta essere impegnato in un'attività neuronale intrinseca causata dal segnale BOLD spontaneo ($\sim 0,01 - 0,1$ Hz) analizzato nella tecnica di rs-fMRI. Infatti, l'encefalo rappresenta solo il 2% della massa totale del corpo umano ma consuma il 20% dell'energia totale per alimentare la continua attività dei neuroni. Gli aumenti nel metabolismo neuronale in presenza di compiti funzionali sono solitamente molto inferiori ($< 5\%$) rispetto al consumo energetico in assenza di essi (resting state). [25]

La correlazione temporale tra eventi neurofisiologici che avvengono in regioni cerebrali spazialmente distanti permette di individuare la presenza di reti neuronali dette resting state networks (RSNs).

Capitolo 3 Connettività

Il cervello umano è organizzato in sistemi paralleli e interagenti di aree anatomicamente connesse e per comprendere le funzioni di questi sistemi è necessario misurare la connettività [26]. In primo luogo, occorre fare una distinzione fondamentale tra connettività anatomica-strutturale, connettività funzionale e connettività effettiva.

La connettività anatomica-strutturale fa riferimento alla presenza di connessioni assoniche e la distribuzione dei fasci di fibre viene stimata mediante la Diffusion Tensor Imaging (DTI).

La connettività funzionale, stimata tramite fMRI, è definita operativamente come la correlazione temporale tra eventi neurofisiologici remoti e non richiede esplicitamente che un evento influenzi l'altro (gli eventi possono essere correlati tra loro poiché innescati da stimoli o neuromodulazioni comuni).

La connettività effettiva, più vicina alla nozione intuitiva di connessione, può essere definita come l'influenza che un sistema neurale esercita su un altro a livello sinaptico o corticale, ma viene talvolta utilizzata quando è possibile dimostrare che gli eventi correlati derivano da un'influenza diretta [27].

Vi è un forte interesse nello sviluppo di tecniche per misurarle nel cervello umano e per collegare i modelli di connettività misurati a informazioni su confini citoarchitettonici e alle proprietà di risposta funzionale, con l'obiettivo di mappare l'intera architettura di connessioni del cervello umano, definita "connettoma".

3.1 Connettività Anatomica-Strutturale

La connettività anatomica-strutturale si associa alla presenza di connessioni assoniche e la distribuzione dei fasci di fibre viene stimata in RM mediante misurazione DTI. Questo metodo sfrutta la proprietà delle molecole d'acqua che si muovono lungo i fasci di materia bianca più velocemente di quanto non facciano contro di essi. Poiché la diffusione ha come ostacolo le membrane delle cellule, alcune regioni del cervello, che presentano strutture cellulari altamente organizzate (come, ad esempio, i fasci di assoni nella materia bianca), mostrano una diffusione fortemente anisotropa rispetto ad altre aree cerebrali [37]. Pertanto, seguendo il percorso individuato dalla concatenazione, di voxel in voxel, delle direzioni di massima diffusione del tensore, è possibile risalire alle informazioni riguardanti l'orientamento dei fasci di fibre e ricostruire, quindi, la connettività delle diverse aree dell'encefalo. La visualizzazione delle informazioni che ne derivano è ottenuta tramite tecniche di fiber tracking o Trattografia, che permettono di ricostruire l'andamento dei fasci di fibre. La grande innovazione della trattografia sta nel fatto che è un metodo non invasivo per identificare i fasci componenti la materia bianca cerebrale in vivo. [38]

3.2 Connettività Funzionale

Tramite l'utilizzo della fMRI, viene valutata la Connettività Funzionale (FC) definita come la correlazione temporale dei voxel attivati tra regioni cerebrali spazialmente distinte [28]. Lo studio della connettività funzionale rende possibile evidenziare le regioni che variano simultaneamente la loro attivazione, con l'assunto che la variazione simultanea di attivazione rifletta lo stesso coinvolgimento nello svolgere una certa funzione. Regioni che modulano simultaneamente la loro attivazione si dicono perciò funzionalmente connesse. Poiché l'attività cerebrale è presente anche in assenza di un compito richiesto dall'esterno, ogni regione del cervello avrà quelle che vengono chiamate fluttuazioni spontanee nel segnale fMRI. Di solito, i valori di correlazione sono compresi nel range da -1 a 1, dove un valore positivo indica un'attivazione simultanea delle aree coinvolte, un valore negativo indica un'attivazione inversa delle regioni, mentre una correlazione nulla indica l'assenza di una relazione temporale tra le aree. Lo studio della connettività funzionale si basa sulla misurazione della correlazione dell'attività del segnale nel tempo tra diverse regioni cerebrali.

In un recente studio di fMRI, è stato osservato che l'attività cerebrale non correlata a specifici compiti non è un semplice rumore casuale, ma riflette un'organizzazione funzionale del cervello. Le reti funzionali che costituiscono questa organizzazione mostrano un alto grado di coerenza. A differenza del rumore casuale, che ha una densità spettrale di potenza piatta, il segnale spontaneo delle

fluttuazioni cerebrali segue una distribuzione in cui alcune frequenze sono responsabili dei pattern di correlazione spaziale osservati nel segnale BOLD spontaneo, che si estendono tipicamente tra 0,01 e 0,1 Hz. [29]

Molti gruppi di ricerca hanno confrontato i pattern di attività BOLD durante il riposo con quelli ottenuti durante l'esecuzione di un compito o durante la presentazione di uno stimolo. In generale, questi studi hanno evidenziato che la correlazione tra due regioni cerebrali che vengono attivate in modo simile durante l'esecuzione di un compito o la presentazione di uno stimolo tende ad aumentare durante le condizioni di attività, mentre la correlazione tra altre regioni può diminuire. Esistono due possibili spiegazioni per le variazioni delle correlazioni tra regioni cerebrali osservate durante l'esecuzione di attività [23]. La prima spiegazione potrebbe essere una riorganizzazione dell'attività sinaptica che porta a cambiamenti nelle correlazioni tra le aree cerebrali presenti nell'attività spontanea. Questo potrebbe indicare una modifica nella connettività funzionale tra le regioni coinvolte. Un'altra possibile spiegazione è che le correlazioni tra le strutture cerebrali rimangano costanti durante le fasi di riposo e di attività, e i cambiamenti osservati nelle correlazioni siano il risultato della sovrapposizione tra l'attività spontanea e l'attività correlata al compito. Questo suggerisce che l'attività spontanea del cervello potrebbe fornire un'importante base per l'organizzazione delle attività cognitive specifiche.

L'analisi di connettività funzionale si basa sulle relazioni statistiche tra i dati misurati e non richiede conoscenze pregresse o assunzioni sulla struttura e sui meccanismi del sistema neurale in esame. Questo approccio è definito "model-free". Questo tipo di indagine è appropriato quando il sistema di interesse è in gran parte sconosciuto, poiché i risultati dell'analisi possono generare ipotesi sul sistema stesso. È importante sottolineare che valutare la connettività funzionale punto per punto di solito non è di grande interesse, mentre invece informazioni rilevanti possono essere ottenute osservando i pattern di attività correlata che emergono dall'insieme di valori che descrivono le relazioni tra coppie di voxel [30].

Tra le tecniche più utilizzate per lo studio della connettività funzionale si hanno: la Seed-based Correlation Analysis (SCA) e l'Independent Component Analysis (ICA).

3.2.1 Analisi Statistica di dati fMRI

Vi sono due diversi metodi di analisi che si focalizzano su dati fMRI: approcci di natura confermativa o model-based, ed approcci di natura esplorativa o model-free. I primi si basano sul fare assunzioni circa i segnali in gioco e sul mettere a punto un modello che rappresenti adeguatamente i segnali d'interesse cosicché possano essere fittati nel miglior modo possibile; gli approcci del secondo tipo prescindono dalla creazione di un modello atto a rappresentare i dati ma piuttosto si occupano di scoprire se all'interno degli stessi vi sia qualche feature interessante o pattern nascosto. La prima linea di pensiero - model-based - ha portato allo sviluppo delle cosiddette tecniche CDA - Confirmatory Data Analysis - tra le quali riveste particolare importanza il General Linear Model (GLM), mentre il secondo approccio - model-free - ha aperto la strada alle tecniche EDA - Exploratory Data Analysis. Un modo per discriminare all'interno delle tecniche EDA consiste nel definire ciò che si ritiene "interessante", ovvero:

- features localizzate nel tempo e/o nello spazio (Clustering)
- features riassuntive la varianza dei dati osservati (PCA, FDA, FA)
- features tra loro massimamente indipendenti (ICA)

Queste tecniche sono tipicamente lineari e multivariate, e differiscono nel modo in cui i dati sono rappresentati dalle varie componenti estratte, le quali esprimono i dati osservati come combinazione lineare di processi spazio-temporali. A differenza quindi dell'approccio di tipo confermativo - focalizzato su modello e stima parametrica - l'analisi esplorativa dei dati è concentrata sui dati, sulla loro struttura e sui modelli che i dati possono suggerire. [31]

3.2.1.1 General linear model

Le tecniche CDA attualmente applicate a dati di fMRI testano ipotesi specifiche circa la risposta attesa del segnale BOLD su specifici voxel, utilizzando modelli di regressione di diversa complessità, lineari o non lineari. La loro peculiarità consiste nel fare forti assunzioni a priori circa le caratteristiche spazio-temporali dei vari segnali contenuti all'interno dei dati. Naturalmente, i pattern spaziali di attivazione dipendono dalla validità e dall'accuratezza di queste assunzioni, ed è quindi evidente come i risultati dipendano fortemente dal modello ipotizzato. Il problema più rilevante, relativamente a queste tecniche hypothesis-driven, consiste nella possibile presenza all'interno dei dati di segnali artefatti non modellati, oppure erroneamente modellati. Ad ogni modo, qualunque discrepanza tra il segnale ipotizzato ed il segnale reale conduce ad un'analisi sub-ottima [32]. Appartenente a questa

prima categoria di tecniche, il General Linear Model (GLM) rappresenta un modello di regressione lineare avente lo scopo di descrivere la relazione esistente tra un particolare stimolo e i dati osservati. Tale modello esprime i dati di fMRI come combinazione lineare pesata di variabili indipendenti più un termine additivo dovuto al rumore, il quale è assunto indipendente e normalmente distribuito. Se indichiamo con Y la matrice dei dati osservati $[K \times N]$, in cui il singolo valore $Y_{k,n}$ rappresenta il valore del voxel n -esimo osservato nel k -esimo istante temporale, otteniamo la seguente rappresentazione matriciale (3):

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

in cui la matrice $X_{[K \times P]}$ prende il nome di design matrix, mentre la matrice $\beta_{[P \times N]}$ è la matrice dei parametri, oggetto della stima GLM; infine, $\varepsilon_{[K \times N]}$ rappresenta il rumore. Graficamente, riferendosi ad un'ipotetica singola scansione ($K = 1$) e tre diverse componenti della design matrix si ottiene la Figura 21.

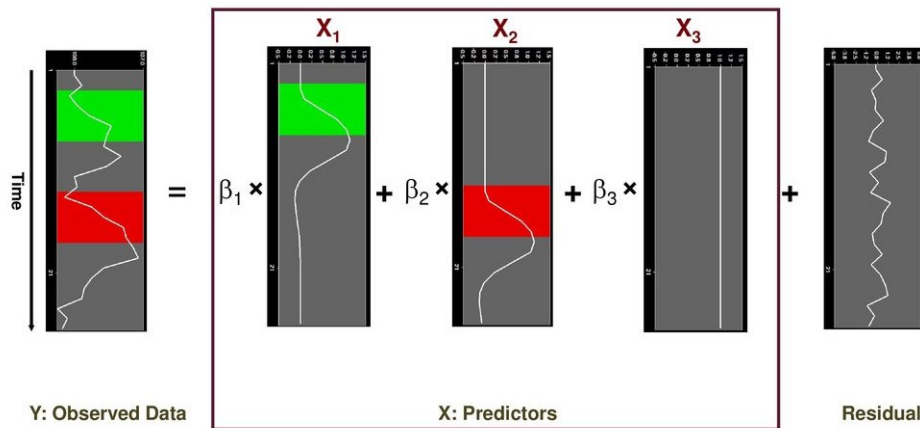


Figura 21: Rappresentazione grafica per il General Linear Model (GLM) per $K = 1$ [33].

È chiaro, quindi, che se la matrice X - opportunamente creata in base alle ipotesi messe a punto - non è in grado di "catturare" tutte le sorgenti coinvolte nella formazione del dato osservato complessivo Y , si ottengono conclusioni scorrette. Quindi, a meno che non sia disponibile un'accurata informazione a priori che permetta di inferire sulla stima di queste sorgenti, l'isolamento dei singoli segnali d'interesse rappresenta un difficile compito per il bioingegnere.

3.2.1.2 Independent Component Analysis

L'Independent Component Analysis (ICA) [34] applicata a dati di fMRI - in veste di tecnica EDA - ha lo scopo di trovare particolari pattern spaziali distribuiti indipendentemente che rappresentino le cosiddette sorgenti di segnale. Le tecniche che si occupano di questo problema, cioè isolare i segnali di interesse all'interno dei dati, sono conosciute come tecniche di blind sources separation (BSS) [35]. L'ICA, infatti, cerca di dividere i dati funzionali in un insieme di mappe spaziali (Spatial ICA), ognuna con un time-course associato. Idealmente, il risultato sarà un insieme di ICs (Independent Components) alcune delle quali chiaramente relative all'attivazione neuronale in seguito al task eseguito, mentre altre saranno collegate ad altri processi fisiologici o ad artefatti. [36]

L'idea alla base di questo modello è considerare il segnale osservato come la somma dei contributi di tutte le componenti indipendenti presenti nel data-set. Nell'equazione (4) sia $\mathbf{x} = [x_1, x_2, \dots, x_M]^T$ il vettore contenente gli N segnali misurati, allora il modello ci dice che:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s} \quad (4)$$

dove $\mathbf{s} = [s_1, s_2, \dots, s_N]^T$ è un vettore N -dimensionale per il quale gli elementi sono a media nulla e si riferiscono alle sorgenti spaziali indipendenti (tipicamente si ha $M \geq N$). La matrice $\mathbf{A}_{M \times N}$, invece, è una matrice di mixing che contiene l'andamento temporale del segnale per ogni componente. L'obiettivo dell'ICA è quello di stimare una matrice di unmixing $\mathbf{W}_{N \times M}$ così che la $\mathbf{z}$ (5) data da:

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

sia una buona approssimazione per $\mathbf{s}$. Essendo la matrice $\mathbf{A}$ incognita, il problema di stima delle sorgenti può essere risolto solo facendo delle ipotesi sulle proprietà statistiche delle sorgenti s_i . L'assunzione che tipicamente viene fatta è quella di considerare sorgenti non-gaussiane e statisticamente indipendenti. Vengono, quindi, definite delle funzioni costo che sono indici di gaussianità da minimizzare o massimizzare [49]. Uno dei problemi di questa tecnica è la scelta del numero di componenti da utilizzare. Scegliere, infatti, un numero troppo elevato può portare alla divisione forzata di componenti che dovrebbero restare unite, selezionarne poche, invece, può portare a delle sorgenti che sono in realtà composizione delle sorgenti indipendenti cercate. Il metodo ICA, però, si presta poco ad un'analisi simultanea con la connettività strutturale, poiché fornisce dei pattern spaziali con aree generalmente piccole che non coprono l'intero encefalo.

3.3 Networks Cerebrali

Come anticipato in precedenza, le correlazioni temporali tra le fluttuazioni del segnale nelle diverse regioni del cervello a riposo sono state interpretate in termini di connettività funzionale. Questi “pattern” di connettività sono stati rappresentati come “network” (reti) tra le regioni attive del cervello e si indicano con il termine resting-state networks (RSNs). Consistono in regioni interconnesse, integrate funzionalmente ma separate anatomicamente che evidenziano un alto livello di connettività funzionale.

In seguito a studi sulla connettività cerebrale in resting state il professore Christian F. Beckmann e i suoi collaboratori identificarono 8 resting state networks, svolgendo l’analisi su un gruppo di 10 soggetti. Nella figura 22 è possibile distinguere le reti:

- a) Aree corticali visive mediali: queste includono aree visive primarie situate nel solco calcarino bilateralmente;
- b) Aree corticali visive laterali: queste includevano il polo occipitale che si estendeva lateralmente verso la giunzione occipito-temporale, comprendendo regioni non primarie della corteccia visiva.
- c) Sistema uditivo: l'attivazione in questo componente comprendeva le cortecce uditive primarie e secondarie. Un'ulteriore attivazione è stata osservata nella corteccia cingolata anteriore, nel giro sopramarginale anteriore e nel talamo;
- d) Sistema sensomotorio: questo includeva l'attivazione nelle circonvoluzioni pre e post centrali che si estendevano dalla fessura Silviana alla parete mediale della fessura interemisferica;
- e) Sistema visuo-spaziale: l'attivazione è stata osservata nella corteccia parietale posteriore alla giunzione occipito-parietale, lungo la linea mediana nel precuneo e nella corteccia cingolata posteriore e nel polo frontale;
- f) Controllo esecutivo: le aree di attivazione includono la corteccia prefrontale superiore e media, il giro cingolato anteriore e paracingolato e la corteccia prefrontale ventrolaterale;
- g) Flusso visivo dorsale destro: mostra l'attivazione nel complesso occipitale laterale destro, nella corteccia parietale inferiore destra, nel solco intraparietale bilaterale e nel giroscopio frontale medio e superiore destro. Il modello complementare è visto nell'emisfero sinistro in (h), inclusa l'attivazione intraparietale bilaterale. [39]

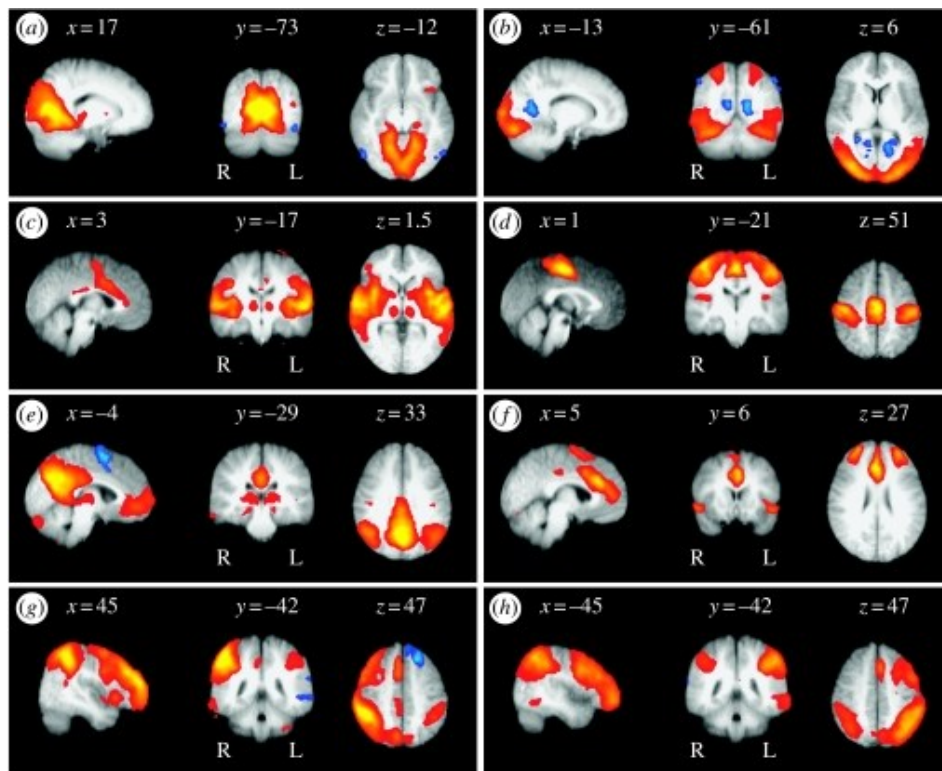


Figura 22: viste sagittale, coronale e assiale di otto diverse RSNs associate a modelli di riposo stimati su un gruppo di 10 soggetti da Beckmann. Tutte le immagini sono state coregistrate nello spazio del template MNI [39].

In uno studio successivo, del 2009, Smith e Beckmann confrontarono le analisi delle RSNs individuate dai dati fMRI di 36 soggetti con l'insieme di un ampio database di studi di attivazione per verificare l'ipotesi che l'insieme di reti funzionali osservate nei dati a riposo fosse strettamente correlato all'insieme derivato da migliaia di diverse condizioni di attivazione. Le 10 mappe (Figura 23) corrispondenti a categorie funzionali interpretabili possono essere considerate le reti funzionali più rappresentative derivate indipendentemente sia dall'analisi di attivazione che dai dati di riposo. Le prime tre mappe (1₂₀, 2₂₀ e 3₂₀) corrispondono alle reti visive, in particolare l'area visiva mediale, l'area visiva occipitale e l'area visiva laterale. La 4₂₀ è la Default Mode Network (DMN), che include la corteccia parietale mediale, la corteccia frontale bilaterale inferiore-laterale-parietale e ventromediale. La 5₂₀ include il cervelletto, la 6₂₀ corrisponde alla rete sensorimotoria e include l'area motoria supplementare, la corteccia sensorimotoria e la corteccia somatosensoriale secondaria. La 7₂₀ coincide con la rete uditiva e include il giro temporale superiore, il giro di Heschl e l'insulaire posteriore, mentre 8₂₀ mappa copre diverse aree mediale-frontali, compreso il cingolato anteriore e il paracingolato, coincide con il controllo esecutivo e corrisponde ad alcuni paradigmi cognitivi, ma

anche azione-inibizione, emozione e percezione-somestesia-dolore. Le mappe 9_{20} e 10_{20} corrispondono alle reti frontoparietali, sono fortemente lateralizzate e sono l'una lo specchio dell'altra. [40]

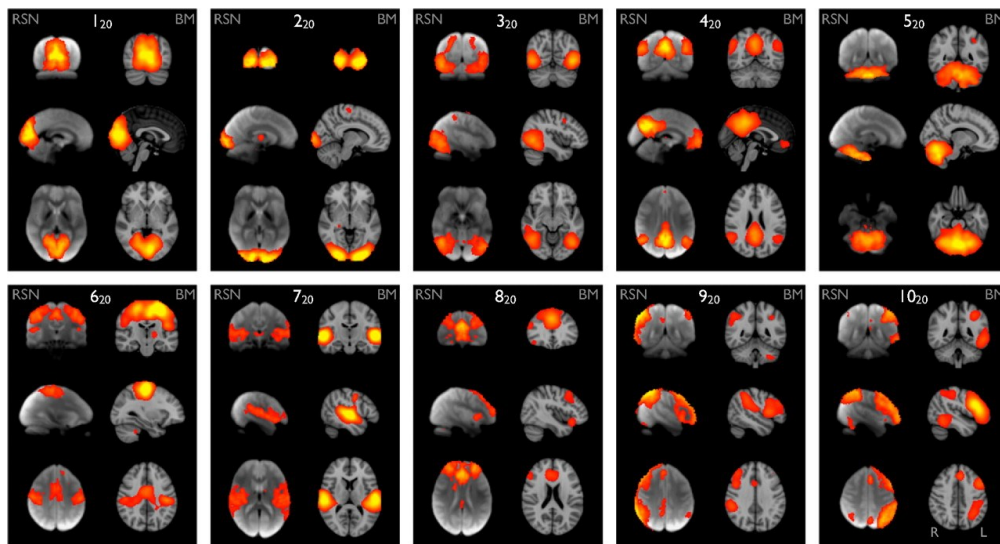


Figura 23: dieci coppie di reti risultanti dall'analisi di 20 componenti indipendenti del database di 29.671 soggetti e del set di dati fMRI a riposo di 36 soggetti. Nella colonna sinistra di ogni coppia sono illustrate le 3 sezioni ortogonali più informative, a destra una media di tutti i soggetti [40].

La DMN è particolarmente rilevante in quanto evidenzia un livello elevato di attività neuronale a riposo, piuttosto che in risposta a task esterni, suggerendo che l'attività di questa rete riflette uno stato di default dell'attività neurale nel cervello umano [41]. L'attività e la connettività della DMN formano il cuore della cognizione umana e includono l'integrazione dei processi emozionali e cognitivi, di monitoraggio del mondo circostante e di divagazione con la mente. Tali attività e connettività sono di speciale interesse per esaminare disfunzioni neurologiche cognitive in disordini cerebrali e psichiatrici [42]. Come descritto in precedenza, la fMRI offre la possibilità di registrare all'unisono l'attivazione di più regioni cerebrali, permettendo lo studio di reti neurali. Generalmente, è possibile esaminare la rete cerebrale con molteplici tecniche, tra le più recenti ed avanzate si annovera l'analisi dei grafi [43]. È necessario, quindi, ricavare le network cerebrali a partire dalle dinamiche temporali di connettività funzionale.

Una network è una rappresentazione matematica di un sistema complesso e reale composto da nodi e collegamenti o link tra di essi [44]. I nodi rappresentano le regioni cerebrali, mentre i collegamenti

possono rappresentare connessioni funzionali, anatomiche o effettive, a seconda del dataset analizzato. Nel caso delle connessioni funzionali, queste corrispondono ai valori delle correlazioni temporali dell'attività cerebrale e possono verificarsi tra coppie di regioni anatomicamente non collegate. La costruzione di una rete a partire dalle immagini di rs-fMRI segue quattro fasi fondamentali [45]. Come illustrato nella Figura 24, inizialmente vengono estratte le immagini funzionali dall'analisi rs-fMRI [46]. Successivamente, si esegue l'analisi delle immagini basate sulle ROIs (Region of Interest). È necessario suddividere anatomicamente il cervello in base agli atlanti anatomici per mappare le ROIs corrispondenti alle regioni cerebrali. Ciò consente di estrarre le serie temporali delle dinamiche cerebrali relative a tali aree. Di conseguenza, viene generata una matrice di connettività associata alla rete cerebrale, in cui ogni tipo di rete è rappresentata dalla propria matrice di connettività o adiacenza. Le righe e le colonne delle matrici rappresentano i nodi, mentre i valori di correlazione presenti nella matrice rappresentano i collegamenti [45]. A questo punto della costruzione, diventa importante scegliere una soglia per generare grafi con diverse densità di connessione [44]. Una volta costruito il grafo, è possibile eseguire la quantificazione di diverse metriche e parametri per l'analisi della rete. In definitiva, la natura dei nodi e dei collegamenti nelle reti neurali individuali è determinata dalla combinazione dei metodi di mappatura cerebrale, degli schemi di suddivisione in ROIs e delle misure di connettività [47].

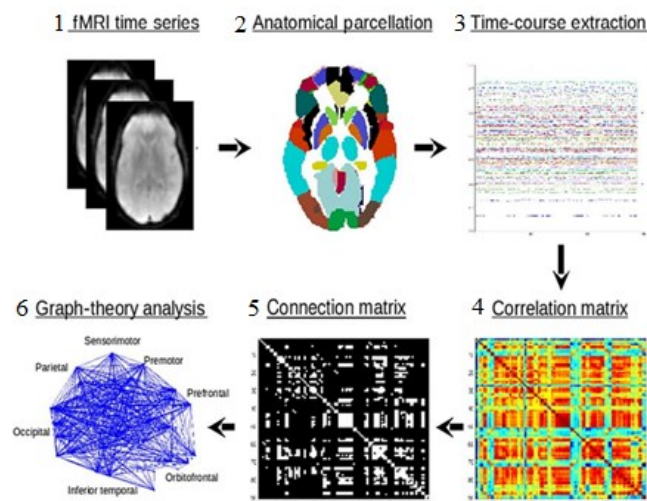


Figura 24: Diagramma di flusso relativo alla costruzione della network cerebrale: 1) Acquisizione immagini di rs-fMRI, 2) Parcellizzazione anatomica per analisi basata su ROIs, 3) Estrazione delle serie temporali di connettività funzionale tra le regioni cerebrali, 4) Generazione delle matrici di correlazione, 5) Generazione delle matrici di connettività, 6) Analisi del grafo tramite metriche descrittive [4].

Capitolo 4 Materiali e Metodi

4.1 Il toolbox CONN: descrizione

CONN è un software open source sviluppato in Matlab e basato su SPM per il calcolo, la visualizzazione e l'analisi della connettività funzionale nelle immagini relative alla risonanza magnetica (fMRI). Creato e sviluppato principalmente da Alfonso Nieto-Castanon, questo toolbox viene utilizzato per analizzare sia dati in resting state (rs-fMRI) che progetti relativi ad attività. L'avvio del software procede tramite la command window di Matlab, digitando “conn”. All'apertura si presenta come in Figura 25, dotato di una GUI (Graphical User Interface) molto intuitiva che mostra tutti gli strumenti messi a disposizione e permette l'accesso in modo sequenziale alle possibili analisi da compiere. [50]

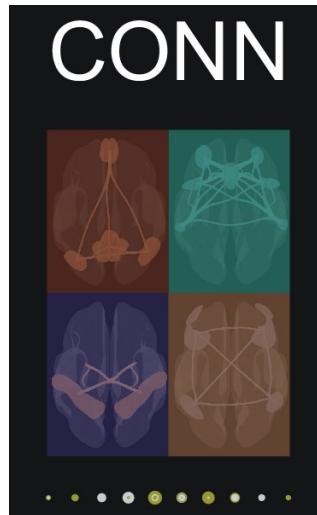


Figura 25: interfaccia grafica di CONN durante l'apertura (CONN).

4.2 Metodo di analisi

Le fasi di elaborazione e analisi in CONN, mostrare in Figura 26, includono:

- Importazione di file funzionali e anatomici DICOM, ANALYZE e NIFTI, volumi grezzi o parzialmente/completamente pre-elaborati;
- Pipeline di pre-elaborazione standardizzate di volumi funzionali e anatomici alimentate da SPM12;
- Controllo di artefatti fisiologici e di movimento residui (ad es. scrubbing, aCompCor,

denoising basato su ICA, regressione globale, filtraggio passa-banda);

- Procedure e misure di controllo di qualità integrate (ad es. grafici dell'istogramma FC, grafici a tappeto del segnale BOLD, spostamento Framewise, misure GCOR, correlazioni FC-QC);
- Analisi e misure di connettività multiple, incluse correlazioni basate su seme (SCA), analisi ROI-to-ROI, analisi di reti complesse, modelli di interazione psicofisiologica generalizzata (gPPI), analisi di componenti indipendenti (ICA di gruppo), ampiezza di fluttuazioni a bassa frequenza (ALFF e fALFF), connettività intrinseca (ICC), omogeneità locale (LCOR), correlazioni globali (GCOR), analisi di pattern multivoxel (MVPA) e analisi di connettività dinamica (dyn-ICA, correlazioni a finestra scorrevole);
- Inferenze e modelli a livello di gruppo e di popolazione, tra cui ANOVA, regressione, disegni longitudinali, sperimentali e misti all'interno e tra i soggetti, statistica univariata e multivariata, controllo per confronti multipli utilizzando tecniche parametriche e tecniche di permutazione/randomizzazione non parametriche. [50]

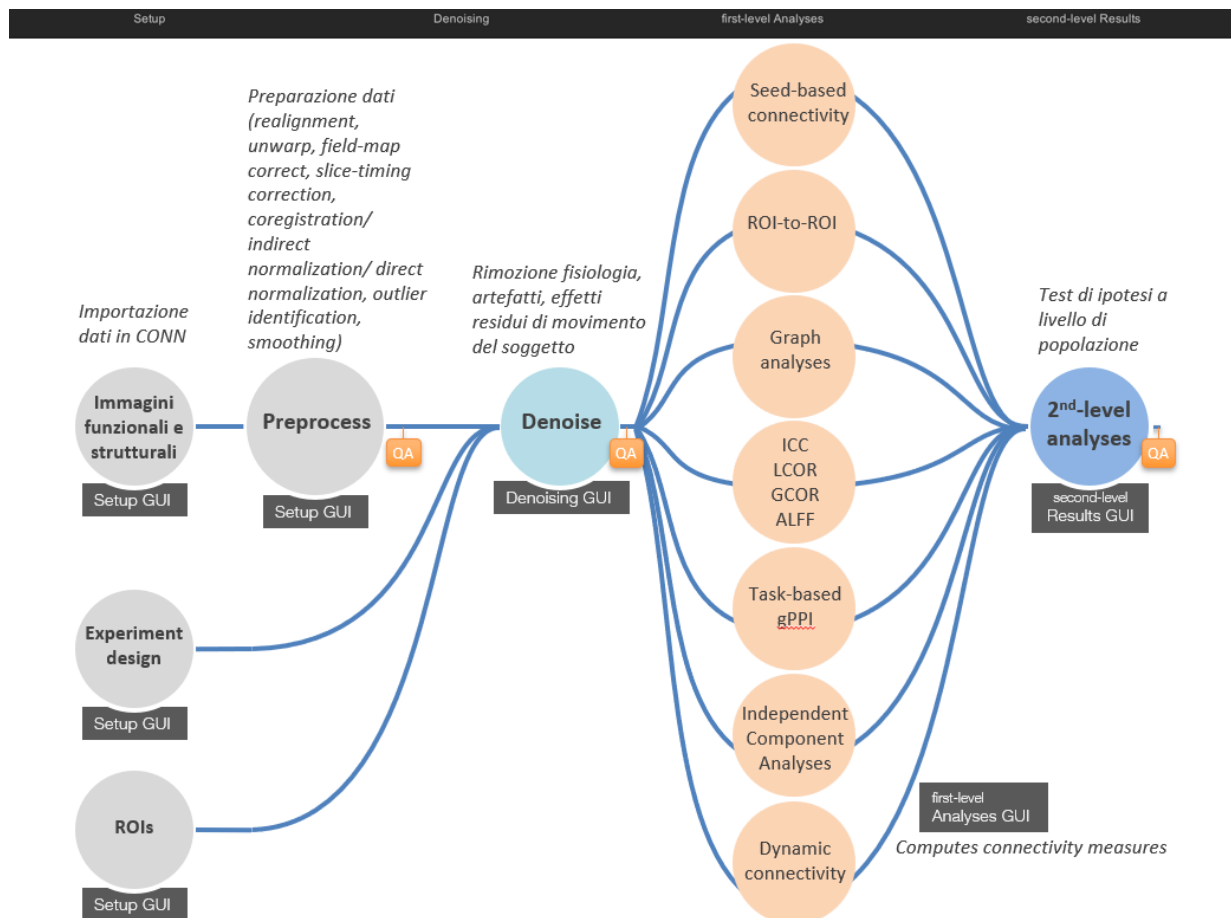


Figura 26: Fasi di elaborazione possibili in CONN riportate in uno schema (CONN).

4.2.1 Pipeline di pre-elaborazione

I dati fMRI appena usciti dallo scanner sono di solito influenzati da una serie di fattori ben noti, dovuti al movimento del soggetto all'interno dello scanner, alle distorsioni spaziali e temporali legate alle specifiche tecniche del protocollo di acquisizione fMRI, nonché agli inevitabili effetti fisiologici e altri effetti non neurologici sul segnale misurato (BOLD). Poiché questi effetti sono onnipresenti, è stata sviluppata una serie di procedure standard per cercare di eliminare o almeno migliorare l'influenza di questi fattori. Queste operazioni sono tipicamente raggruppate nell'ambito della pre-elaborazione e consistono in una serie di passi sequenziali, ognuno dei quali tenta di correggere uno o più di questi fattori, che sono applicati ai dati funzionali e anatomici grezzi prima di procedere a qualsiasi forma di attivazione funzionale o di analisi della connettività. Anche se le specificità di queste procedure variano tra le diverse implementazioni software (ad esempio, SPM, FSL, AFNI, ecc.) l'intento e l'approccio generale sono simili.

Una pipeline di pre-elaborazione minima di un qualsiasi pacchetto software includerà tipicamente passaggi finalizzati a:

- a) stimare e correggere gli effetti derivanti dal movimento del soggetto all'interno dello scanner (riallineamento);
- b) stimare e correggere le distorsioni spaziali dovute a disomogeneità del campo magnetico all'interno dello scanner (correzione della distorsione di suscettibilità o susceptibility distortion correction);
- c) correggere le distorsioni temporali dovute alla natura intrinsecamente sequenziale del protocollo di acquisizione (correzione della temporizzazione delle sezioni o slice timing correction);
- d) allineare i dati funzionali e anatomici tra soggetti diversi in modo da minimizzare l'influenza delle differenze anatomiche tra i soggetti (coregistrazione e normalizzazione).

La pipeline di pre-elaborazione predefinita di CONN, etichettata come “default preprocessing pipeline for volume-based analyses (direct normalization to MNI-space)” nella GUI di CONN (Figura 27), esegue le seguenti fasi: riallineamento e raddrizzamento funzionale, correzione dello slice-timing; identificazione degli outlier; segmentazione diretta e normalizzazione; levigatura (smoothing) funzionale.

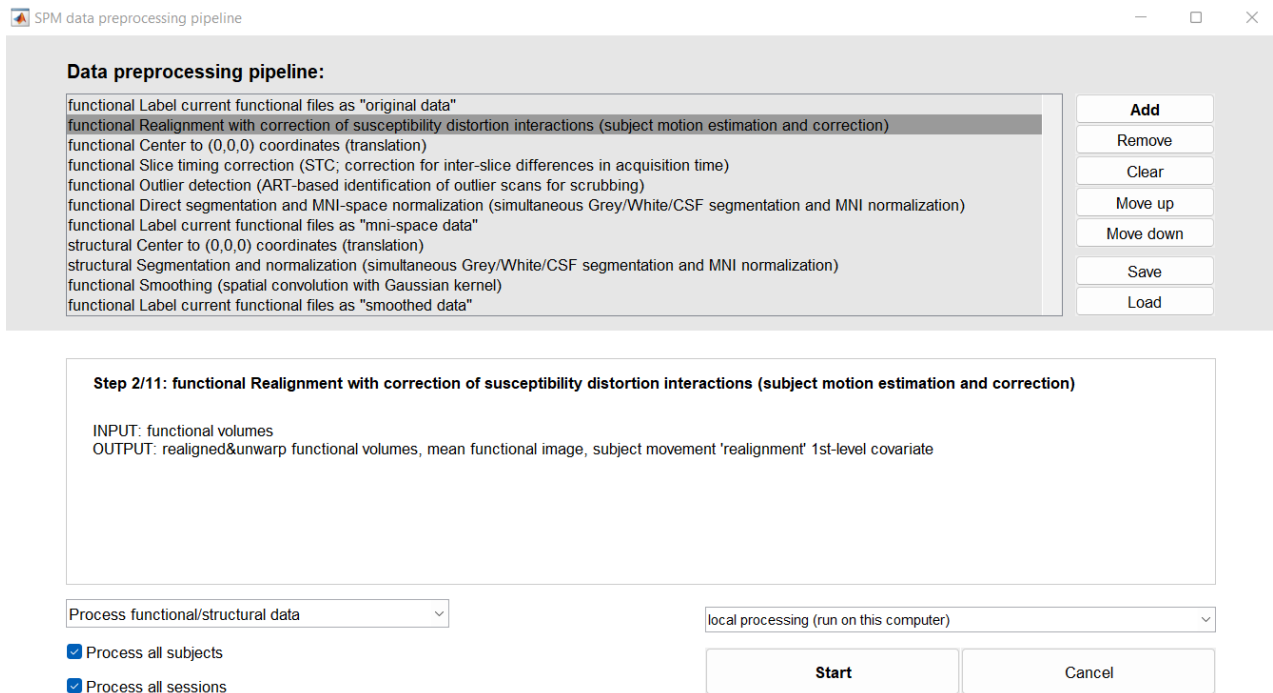


Figura 27: lista di passaggi di pre-processing definiti da una pipeline di default (CONN).

Riallineamento funzionale e unwarp

I dati funzionali vengono riallineati utilizzando la procedura SPM12 realign & unwarp [51], in cui tutte le scansioni sono coregistrate e ricampionate rispetto a un'immagine di riferimento (prima scansione della prima sessione) utilizzando l'interpolazione b-spline. Questa procedura affronta anche la potenziale distorsione della suscettibilità in base alle interazioni di movimento, stimando le derivate del campo di deformazione rispetto al movimento della testa, e ricampionando i dati funzionali per farli corrispondere al campo di deformazione dell'immagine di riferimento. Se è disponibile una sequenza a doppia eco, la disomogeneità del campo all'interno dello scanner (mappa di campo) viene stimata e utilizzata per la correzione della distorsione della suscettibilità (SDC) come parte della fase di unwarp, in cui i dati funzionali vengono ricampionati lungo la direzione della codifica di fase per correggere lo stato di deformazione assoluta dell'immagine di riferimento causata da disomogeneità di campo all'interno dello scanner.

Correzione slice-timing

I due metodi più comunemente utilizzati per la creazione di volumi sono l'acquisizione di sezioni sequenziali e interlacciate. L'acquisizione sequenziale delle sezioni cattura ciascuna sezione adiacente

consecutivamente, dal basso verso l'alto (ascendente) o dall'alto verso il basso (discendente). L'acquisizione delle sezioni interlacciate acquisisce in modo non continuo e quindi colma gli spazi vuoti al secondo passaggio. Il disallineamento temporale tra le diverse sezioni dei dati funzionali, introdotto dalla natura del protocollo di acquisizione fMRI, viene corretto utilizzando la procedura SPM12 slice-timing correction (STC) [52], in cui i dati funzionali vengono spostati nel tempo e ricampionati utilizzando un'interpolazione sincrona per farli coincidere con il tempo al centro di ogni TA (tempo di acquisizione).

Identificazione degli outlier

Le scansioni potenzialmente anomale vengono identificate in base al segnale BOLD globale osservato e alla quantità di movimento del soggetto nello scanner. Le acquisizioni con uno spostamento framewise superiore a 0,9 mm o con variazioni globali del segnale BOLD superiore a 5 s.d. (standard deviation) vengono segnalate come potenziali outlier (nota: un'impostazione alternativa "conservativa" in CONN utilizza soglie di 0,5 mm e 3 s.d. mentre un'impostazione alternativa "liberale" utilizza soglie di 2 mm e 9 s.d.). Lo spostamento in base al fotogramma viene calcolato a ogni timepoint (punto di riferimento temporale) considerando un volume di delimitazione di 140x180x115mm intorno al cervello e stimando lo spostamento più grande tra sei punti di controllo posizionati al centro delle facce della scatola di delimitazione. La variazione del segnale BOLD globale viene calcolata a ogni timepoint come la variazione del segnale BOLD medio all'interno della maschera media globale di SPM, scalato in unità di deviazione standard.

Segmentazione diretta e normalizzazione

I dati funzionali e anatomici sono normalizzati nello spazio standard MNI (Montréal Neurological Institute) e segmentati in materia grigia, materia bianca e tessuto CSF (liquido cerebrospinale) utilizzando la procedura di segmentazione e normalizzazione unificata SPM12 [53]. Per confrontare l'anatomia di più cervelli umani o calcolare statistiche di gruppo, è necessario definire un sistema di riferimento comune. Due tipi di sistemi normalizzati sono stati ampiamente utilizzati in letteratura in passato: l'atlante definito da Jean Talairach e le coordinate MNI. Mentre il sistema Talairach è stato progressivamente abbandonato, lo "spazio MNI" si è sempre più diffuso, grazie allo sviluppo di metodi di normalizzazione automatica in software di neuroimaging open-source. Le coordinate MNI si riferiscono allo spazio normalizzato definito in SPM12 come I549 space. Come le coordinate MRI, anche queste coordinate sono espresse in mm e gli assi (X, Y, Z) sono orientati:

- Asse X: da sinistra a destra
- Asse Y: da posteriore ad anteriore
- Asse Z: da inferiore a superiore

Il primo voxel nell'angolo sinistro-posteriore-inferiore del volume MRI è indicizzato (1,1,1). Il calcolo di questa normalizzazione MNI per un soggetto non altera l'MRI di input ma memorizza solo una trasformazione che consente di fare riferimento al volume MRI del soggetto con coordinate MNI standardizzate. Questa procedura esegue iterativamente la classificazione dei tessuti, stimando le mappe di probabilità dei tessuti (TPM) dai valori di intensità dell'immagine funzionale/anatomica di riferimento, e la registrazione, stimando la trasformazione spaziale non lineare che approssima al meglio le TPM posteriori e precedenti, fino alla convergenza. La normalizzazione diretta applica questa segmentazione unificata e normalizzazione separatamente per i dati funzionali, utilizzando il segnale BOLD medio come immagine di riferimento, e per i dati strutturali (Figura 28), utilizzando come immagine di riferimento il volume grezzo pesato in T1. Sia i dati funzionali che quelli anatomici sono ricampionati a un volume predefinito di 180x216x180 mm, con voxel isotropi di 2 mm per i dati funzionali e di 1 mm per quelli strutturali, utilizzando un'interpolazione spline del quarto ordine.

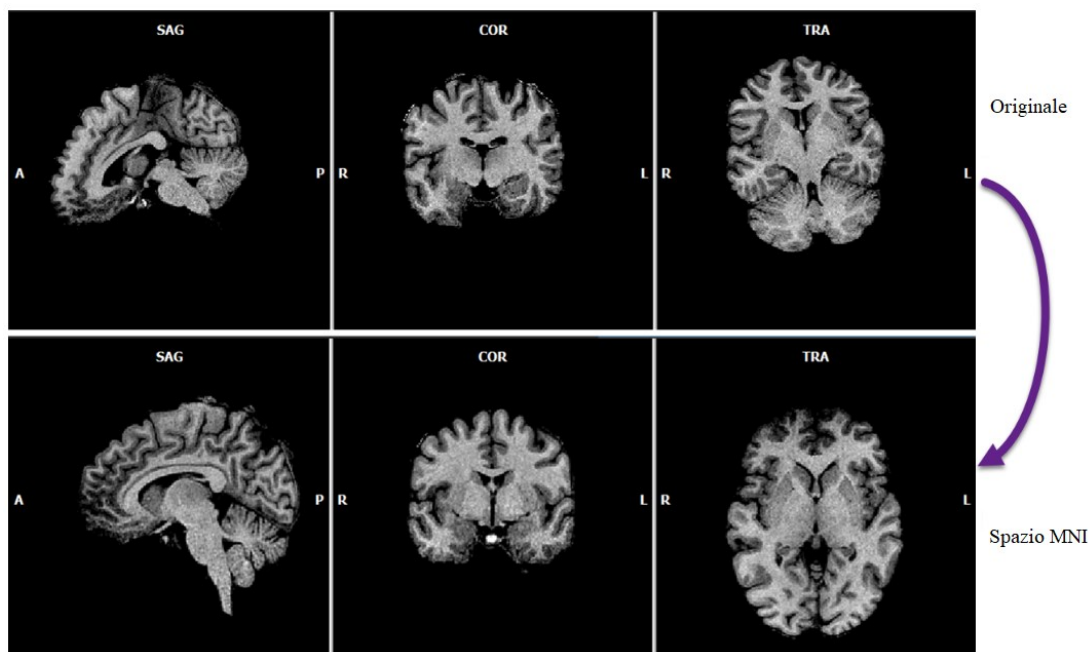


Figura 28: confronto di immagini anatomiche prima e dopo la normalizzazione nello spazio MNI.

Convenzione radiologica.

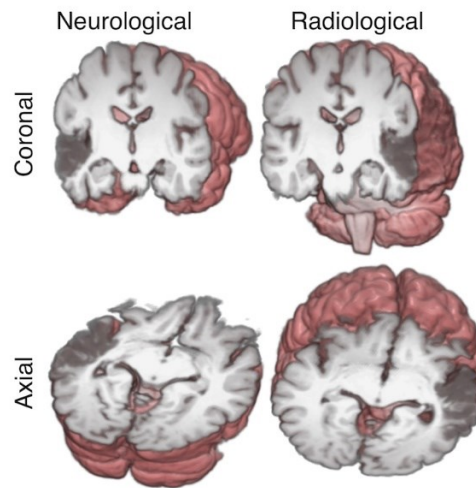


Figura 29: il soggetto ha un ictus nel lobo temporale sinistro, che causa un'area scura nell'immagine della RM.

Il toolbox CONN utilizza la convenzione neurologica per la visualizzazione delle immagini (Figura 29): la destra e la sinistra nella realtà rappresentano relativamente la destra e la sinistra nella figura.

Smoothing funzionale

Infine, i dati funzionali vengono smussati, ovvero appianati sostituendo il segnale in ciascun voxel con una media ponderata dei voxel vicini. Il metodo utilizzato è la convoluzione spaziale con un kernel gaussiano di 8 mm di larghezza massima (FWHM, full width at half maximum), al fine di aumentare il rapporto segnale/rumore BOLD. Dopo questa procedura, l'immagine risulta essere sfocata, a causa della diminuzione della risoluzione spaziale.

Valutazione risultati della pre-elaborazione

Durante la pre-elaborazione dei dati, una buona abitudine è quella di esaminare le immagini prima e dopo ogni passaggio per determinare se il processamento è andato a buon fine. Dal pulsante 'QA plots' nella GUI CONN è possibile selezionare i controlli a cui si è interessati. Nella Figura 30 sono presenti solo quelli predefiniti che permettono di visualizzare controlli come i dati funzionali e strutturali sul modello MNI e i parametri di movimento.

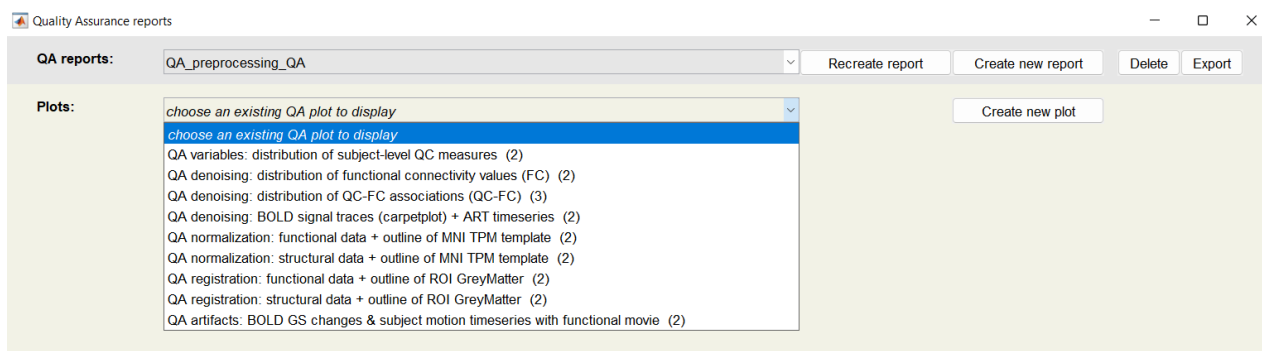


Figura 30: report Quality Assurance per valutare la qualità dei passaggi di elaborazione (CONN).

Dopo il preprocessing CONN rende disponibili tre nuove risorse: le ROIs, le covariate di primo livello e le covariate di secondo livello.

Per ciascuna ROI, CONN può estrarre una serie temporale BOLD media all'interno dei voxel della ROI (opzione “compute average timeseries”), più serie temporali da una decomposizione dei componenti principali del segnale BOLD all'interno dei voxel della ROI (opzione “compute PCA decomposition”) o una somma pesata del segnale BOLD all'interno dei voxel della ROI (pesando ciascuna serie temporale del voxel con un fattore diverso; opzione “compute weighted sum timeseries”).

Le covariate di primo livello sono tre: realignment, QC_timeseries, scrubbing. La prima, definita ‘realignment’, contiene i parametri relativi ai movimenti effettivi del soggetto stimati nel tempo, e consiste di una serie temporale rappresentante quanto il soggetto si sia mosso nello scanner. La seconda, la ‘QC_timeseries’, consiste di due serie temporali, di cui la prima descrive quanto il segnale BOLD globale cambi tra una scansione e l'altra, e rappresenta una misura utile per identificare potenziali outliers, mentre la seconda serie temporale, detta la ‘Framewise Displacement’ (FD), è una misura di quanto il soggetto si sia mosso durante le acquisizioni, ulteriore evidenza per gli outliers. La terza covariata, lo ‘scrubbing’, corrisponde all'identificazione dei potenziali outliers nelle due serie temporali viste sopra (variazioni segnale BOLD e movimenti del soggetto).

Le covariate di secondo livello sono parametri che rappresentano diversi aspetti sulla qualità dei dati per ogni soggetto. Tra questi troviamo il numero di scansioni valide dopo la rimozione degli outliers, il numero di outliers, i valori massimi e medi dei movimenti dei soggetti ed infine i valori massimi e medi delle variazioni del segnale BOLD globale.

4.2.2 Denoising pipeline

Successivamente al preprocessing, il segnale BOLD spesso contiene ancora una quantità considerevole di rumore o di variabilità non neurale, dovuta a una combinazione di effetti fisiologici, ed effetti residui di movimento del soggetto. Questi fattori residui sono particolarmente problematici nel contesto delle analisi di MRI della connettività funzionale (fcMRI), perché introducono distorsioni evidenti in tutte le misure di connettività funzionale. Per questo motivo, le fasi di pre-elaborazione convenzionali nel contesto delle analisi fcMRI hanno privilegiato strategie molto più conservative di quelle spesso presenti nelle analisi fMRI basate sull'attivazione, concentrandosi sull'eliminazione o almeno riduzione al minimo dell'influenza di queste componenti di rumore residuo nel segnale BOLD. Queste strategie aggiuntive sono spesso inquadrare sotto il termine generale di denoising.

La pipeline di denoising predefinita di CONN combina due fasi: la regressione lineare dei potenziali effetti di confondimento del segnale BOLD e il filtraggio passa-banda temporale.

Regressione lineare

I fattori identificati come potenziali effetti di confondimento del segnale BOLD stimato vengono valutati e rimossi separatamente per ogni voxel, per ogni soggetto e sessione (run) funzionale utilizzando regressione ai minimi quadrati (Ordinary Least Square, OLS), per proiettare ogni segnale BOLD nel sottospazio ortogonale a tutti i potenziali effetti confondenti.

I potenziali effetti di confondimento utilizzati nella pipeline di denoising predefinita di CONN implementano una procedura di correzione del rumore basata su componenti anatomiche (aCompCor), e includono componenti di rumore provenienti dalla materia bianca cerebrale e dalle aree cerebrospinali [54], parametri stimati di movimento del soggetto [55], scansioni con outlier identificati o scrubbing [68], effetti di sessione lineari costanti e di primo ordine ed effetti di compito costanti, se applicabili [56]:

- componenti di rumore provenienti dalla materia bianca e dalle aree cerebrospinali: i potenziali effetti confondenti sono definiti in base al segnale BOLD osservato all'interno di ognuna delle due aree di rumore anatomicamente definite, calcolate applicando una fase di erosione binaria di un voxel alle maschere di voxel con valori superiori al 50% nella materia bianca e nelle mappe di probabilità posteriori del CSF. All'interno di ciascuna area vengono stimate cinque potenziali componenti di rumore [57]: la prima calcolata come segnale BOLD medio, e le successive quattro calcolate come le

prime componenti di una PCA (principal component analysis) della covarianza all'interno del sottospazio ortogonale al segnale BOLD medio e a tutti gli altri potenziali effetti confondenti;

- parametri stimati di movimento del soggetto (realignment): un totale di 12 potenziali componenti di rumore sono definite a partire dai parametri di movimento del soggetto al fine di minimizzare la variabilità BOLD legata al movimento: 3 parametri di traslazione e 3 di rotazione più le loro derivate del primo ordine;

- scrubbing: un numero variabile di componenti di rumore (uno per ciascuna scansione di outlier durante la fase di pre-elaborazione di identificazione degli outlier) viene utilizzato come potenziale effetto di confondimento per rimuovere ogni influenza di queste scansioni outlier sul segnale BOLD;

- effetti della sessione e del compito: tendenze costanti e lineari del segnale BOLD all'interno di ogni sessione, così come gli effetti principali del compito o della sessione convolti con una funzione di risposta emodinamica canonica, vengono definite come componenti di rumore aggiuntive, al fine di ridurre l'influenza di tendenze lente, transienti di magnetizzazione e risposte costanti indotte dal compito nel segnale BOLD, se applicabile.

Filtraggio temporale passa-banda

Le frequenze temporali inferiori a 0,008 Hz o superiori a 0,09 Hz vengono rimosse dal segnale BOLD per concentrarsi sulle fluttuazioni a bassa frequenza, riducendo al minimo l'influenza del rumore fisiologico, del movimento della testa e di altre fonti di rumore. Il filtraggio è implementato utilizzando un'operazione di trasformazione discreta del coseno per ridurre al minimo gli effetti al confine della finestra scelta ed è eseguito dopo la regressione per evitare qualsiasi divario di frequenza nella procedura di regressione del disturbo [58].

Valutazione risultati del denoising

L'effetto del denoising che agisce per minimizzare l'influenza di fattori artefattuali sulle misure di connettività funzionale può essere meglio caratterizzato stimando la distribuzione dei valori di connettività funzionale (FC) tra coppie di punti selezionati casualmente all'interno del cervello prima e dopo il denoising. Considerando il segnale BOLD dopo una pre-elaborazione standard (ma prima del denoising), le distribuzioni di FC mostrano una variabilità estremamente ampia tra le sessioni e tra i soggetti, e distribuzioni asimmetriche con diversi gradi di bias positivi, coerenti con l'influenza del bias, compatibili con l'influenza di effetti fisiologici globali o su larga scala e di movimento del

soggetto (Figura 31 istogrammi superiori). Dopo il denoising le distribuzioni FC mostrano distribuzioni approssimativamente centrate, con piccole code ma sensibilmente più grandi nel lato positivo, e una considerevole ridotta variabilità tra le sessioni e tra i soggetti (Figura 31 istogrammi inferiori).

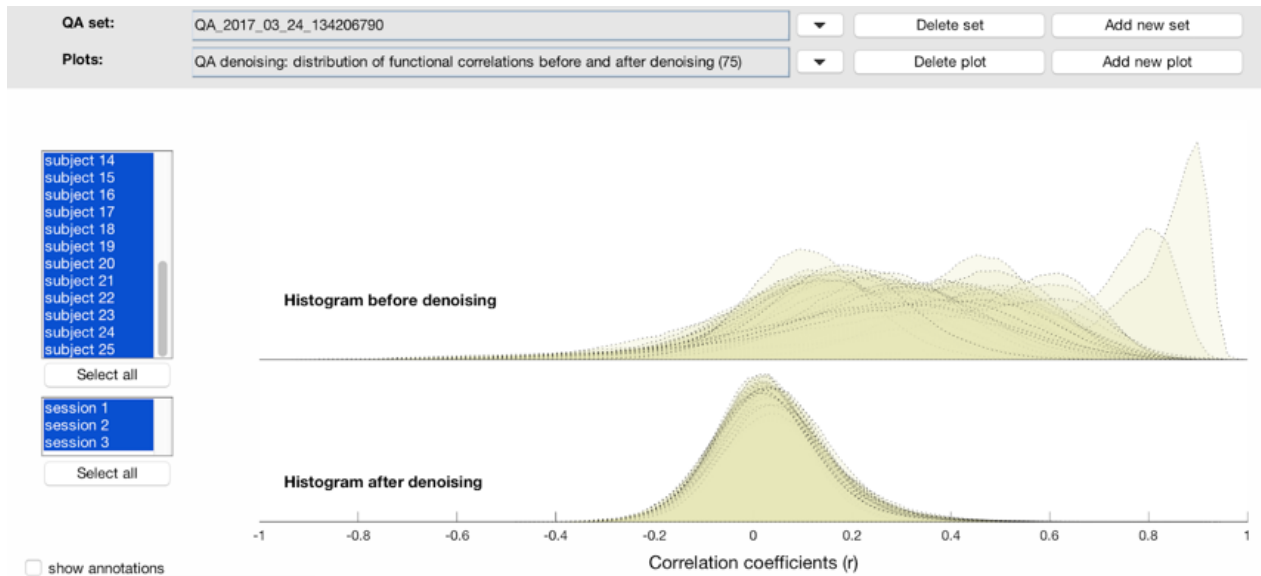


Figura 31: Distribuzione delle correlazioni funzionali (FC) per 3 sessioni e 25 soggetti considerati a titolo esempio (CONN) [82].

4.2.3 Analisi di primo livello: misure di connettività

La fcMRI tenta di quantificare il livello di integrazione funzionale tra le diverse aree cerebrali misurando le correlazioni temporali tra le fluttuazioni del segnale BOLD in queste aree. Esistono centinaia di diverse misure della connettività funzionale e approcci analitici diversi, ma in seguito sarà descritta solo una piccola parte di questa grande varietà di metodi, scegliendo di presentare solo le misure disponibili in CONN (Figura 32), che sono classificate nelle categorie:

- misure seed-based, finalizzate a studiare le proprietà della FC da singoli seed scelti a priori;
- misure ROI-to-ROI, che mirano a studiare i modelli di connettività tra più regioni di interesse;
- approcci teorici a grafo, volti a studiare le proprietà topologiche dei grafi di connettività funzionale tra più regioni;
- misure network-based, finalizzate allo studio delle proprietà del connettoma dell'intero cervello;

e) misure di connettività dinamica, volte a studiare le fonti di variabilità temporale dei modelli di connettività funzionale.

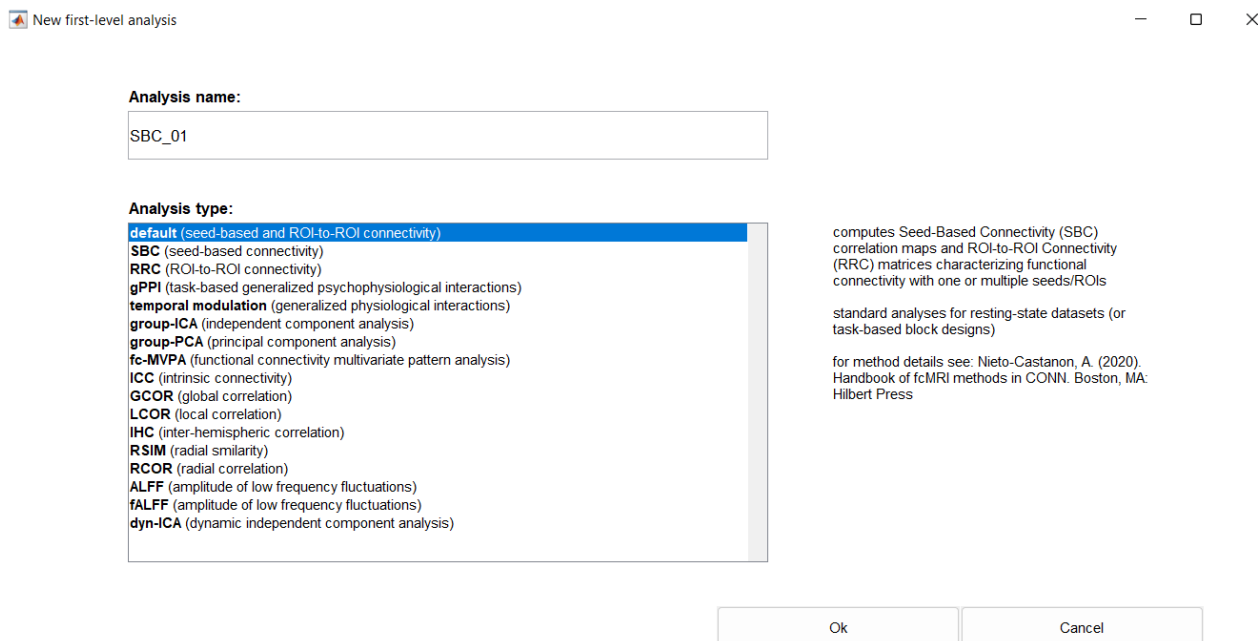


Figura 32: selezione delle misure di connettività funzionale per l'analisi di primo livello (CONN).

Le analisi di secondo livello, invece, permettono ai ricercatori di fare inferenze su proprietà di gruppi o popolazioni, generalizzando a partire dalle osservazioni di solo un sottoinsieme di soggetti in uno studio. Il toolbox CONN utilizza il Modello Lineare Generale (GLM) per tutte le analisi di secondo livello dei dati di connettività funzionale. Questo lavoro si concentra solo sull'analisi di primo livello non avendo un numero sufficiente di soggetti per eseguire uno studio di popolazione.

Seed-Based Connectivity Analysis

L'acquisizione del segnale BOLD è frutto di un campionamento temporale. Per questo motivo, ogni voxel dell'immagine ha una time-series che dipende dall'attività neuronale in quel punto nel tempo. La SCA consiste nel calcolare la correlazione tra il segnale medio prelevato in una regione di riferimento, chiamata seed, e i segnali estratti da tutte le altre aree cerebrali (Figura 33). Il risultato della SCA è una mappa di connettività nella quale per ogni voxel è visualizzato lo Z-score indicante quanto il segnale in quel voxel è correlato con il segnale estratto dal seed. Lo Z-score di un dato, appartenente ad un insieme di valori che presentano una distribuzione gaussiana di media μ e varianza σ^2 , indica a quante deviazioni standard σ si trova il dato rispetto al valore medio μ di popolazione.

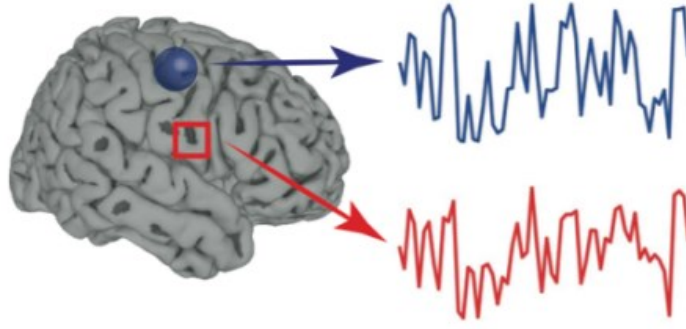


Figura 33: Mappa di connettività basata sulla tecnica SCA. È stato scelto un seed (in blu) a cui è associata la media dei time-series del segnale BOLD di ogni voxel al suo interno. Prendendo, ad esempio, il time-series proveniente da un voxel all'interno del box rosso si osserva come questo sia simile a quello del seed comportando, quindi, un alto valore per il coefficiente di correlazione [59].

Il risultato della SCA è una mappa di connettività in cui, per ogni voxel o ROI, viene visualizzato il valore del parametro di correlazione con il seed. Le mappe SCA vengono calcolate come i coefficienti di correlazione bivariata trasformati mediante Fisher tra la serie temporale BOLD del seed/ROI e la serie temporale BOLD di ciascun voxel individuale dalla (6):

$$r(x) = \frac{\int S(x, t) R(t) dt}{\left(\int R^2(t) dt \int S^2(t) dt \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (6)$$

$$Z(x) = \tanh^{-1}(r(x)) \quad (7)$$

dove S rappresenta la serie temporale BOLD di ciascun voxel (considerando per semplicità che tutte le serie temporali siano centrate sulla media zero), R è la serie temporale BOLD media all'interno del seed/ROI, r è la mappa spaziale dei coefficienti di correlazione di Pearson e Z nell'equazione (7) è la mappa SCA dei coefficienti di correlazione trasformati mediante Fisher per questo seed/ROI. Il pattern di connettività con un seed/ROI individuale spesso comprende la stessa area, quantificando indirettamente il livello di omogeneità all'interno di questa regione, ma coinvolge anche spesso diverse altre aree distanti, quantificando direttamente la forza della connettività inter-regionale. Questa tecnica richiede un preventivo filtraggio passa banda dei segnali, in modo da analizzare solamente le correlazioni tra i segnali nel range di frequenze 0,01-0,1 Hz. Una volta calcolata la correlazione, si determina una soglia in modo da identificare quali siano i voxel significativamente

correlati con il seed [59]. Un seed può essere definito in più modi a seconda del tipo di connettività interessata:

- attraverso la normalizzazione delle immagini funzionali su degli atlanti anatomici (atlas) sui quali sono definite delle regioni di riferimento standardizzate (whole brain networks);
- utilizzando come seed le aree di attivazione neuronale ottenute in seguito ad uno specifico task per valutare le connessioni all'interno di una determinata network.

Misure di connettività ROI-to-ROI

Le misure di connettività ROI-to-ROI (ROI-to-ROI connectivity, RRC) caratterizzano la connettività tra tutte le coppie di ROIs tra un set predefinito di regioni. La definizione di queste misure segue esattamente la stessa organizzazione e le stesse proprietà delle misure di connettività basate sul seme nella sezione precedente, ma evita l'asimmetria SCA tra semi (ROIs) e target (voxel).

Le matrici RRC rappresentano il livello di connettività funzionale tra ogni coppia di ROIs. Ogni elemento di una matrice RRC è definito come il coefficiente di correlazione bivariata trasformato da Fisher tra una coppia di serie temporali BOLD delle ROIs dall'equazione (8):

$$r(i, j) = \frac{\int R_i(t) R_j(t) dt}{\left(\int R_i^2(t) dt \int R_j^2(t) dt \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (8)$$

$$Z(i, j) = \tanh^{-1}(r(i, j)) \quad (9)$$

dove R è la serie temporale BOLD media all'interno di ciascuna ROI (per semplicità tutte le serie temporali sono considerate centrate a media zero), r è una matrice di coefficienti di correlazione e Z è la matrice RRC dei coefficienti di correlazione trasformati secondo Fisher (9). Queste tecniche ROI-to-ROI sono spesso utilizzate quando i ricercatori sono interessati allo studio simultaneo di intere reti di connessioni.

Misure di connettività ottenute dalla teoria dei grafi (livello ROI)

Tutte le misure dei grafi a livello di ROI sono basate su grafi non direzionali definiti dall'utente tramite nodi e link, che rappresentano, rispettivamente, le regioni cerebrali ed il parametro che caratterizza il

tipo di connessione utilizzata. Per ogni soggetto (e condizione) viene calcolata una matrice di adiacenza del grafo, A , sogliando la matrice di correlazione ROI-to-ROI (RRC) associata r con un valore di soglia assoluto (ad esempio, $z > 0,5$) o relativo (ad esempio, il 10% più alto). Quindi, dai grafi risultanti, si ottengono una serie di misure che riguardano le proprietà topologiche di ciascuna ROI all'interno del grafo e dell'intera rete di ROIs [60, 61].

Misure di connettività Network-Based

Le misure delle reti tentano di riassumere le proprietà dell'intero connettoma voxel-to-voxel (tutte le connessioni funzionali tra ogni coppia di voxel nel cervello) in una serie di misure ridotte e interpretabili per ogni singolo voxel. Queste includono misure che riguardano proprietà specificate a priori e che stimano il modo in cui tali proprietà sono espresse in ogni singolo soggetto, quali connettività intrinseca (IC), correlazione globale (GCOR) e correlazione locale (LCOR), così come misure basate sui dati che sono prima informazioni su proprietà a livello di gruppo e poi tentano di determinare come queste proprietà osservate siano espresse in ogni singolo soggetto, come le Analisi delle Componenti Indipendenti (group-ICA), Analisi delle Componenti Principali (group-PCA) e Analisi dei Modelli Multivariati (group-MVPA).

Misure di connettività dinamica

Le misure di connettività dinamica hanno lo scopo di caratterizzare e studiare le fonti di variabilità temporale nei modelli di connettività funzionale. Alcune delle tecniche di connettività dinamica più comuni sono basate su approcci sliding-window, in cui le misure di connettività funzionale di interesse sono stimate su finestre temporali relativamente piccole, al fine di analizzare i potenziali cambiamenti nel corso del tempo. Inoltre, vi è una tecnica attualmente in fase di sviluppo, la dyn-ICA, finalizzata alla caratterizzazione di cluster di connessioni che mostrano simili variazioni temporali nella connettività funzionale.

Capitolo 5 Analisi dei dati

5.1 Dataset

I dati utilizzati in questa tesi sono stati ottenuti da due soggetti. Il primo soggetto è una donna sana che, al momento dell'acquisizione, aveva 31 anni. Il secondo è un soggetto di sesso maschile, sottoposto a resezione totale del CC. L'acquisizione è stata effettuata quando l'uomo aveva 42 anni ed erano trascorsi 19 anni dal secondo intervento di callosotomia.

I dati e le immagini strutturali pesate T1 per entrambi i soggetti sono stati acquisiti con uno scanner 1.5 Signa HDxt GE Medical System MRI, mentre le immagini funzionali sono state acquisite usando una sequenza EPI a gradiente d'eco con parametri TE = 50 ms, TR = 3000 ms, angolo di flip = 90°, numero di fette assiali = 144, lo spessore della fetta di 4 mm (soggetto split) e di 5 mm (soggetto sano) senza spazi tra le fette acquisite. La durata del processo di acquisizione è stata di circa 14 minuti per il soggetto split brain e di 12 minuti per il soggetto sano. La Tabella 1 riporta i dati appena descritti.

	<i>SOGGETTO SANO</i>	<i>SOGGETTO SPLIT BRAIN</i>
<i>Slice Thickness (mm)</i>	5	4
<i>Number of Slices</i>	144	144
<i>TE (Time Echo) (ms)</i>	50	50
<i>TR (Repetition Time) (ms)</i>	3000	3000
<i>Flip Angle (°)</i>	90	90
<i>TA (Time Acquisition)</i>	12:12:4	14:18:17

Tabella 1: parametri di acquisizione sui 2 soggetti studiati.

Le immagini ottenute dalla fMRI nel formato DICOM (Digital Imaging and COmmunications in Medicine) sono state convertite in precedenza nel formato NIFTI (Neuroimaging Informatics Technology Initiative), supportato da CONN.

5.2 Setup

Il primo step per poter avviare un'analisi con il toolbox CONN consiste nel creare un nuovo progetto o aprirne uno esistente. Dopo aver creato il nuovo progetto, è necessario inserire le informazioni di base per avviare l'analisi: numero di soggetti, numero di sessioni, tempo di ripetizione e tipo di acquisizione. In questo progetto sono stati considerati due soggetti, una sola sessione, un tempo di ripetizione pari a 3 s e le acquisizioni sono state effettuate in modo continuo, come riportato in Figura 34.

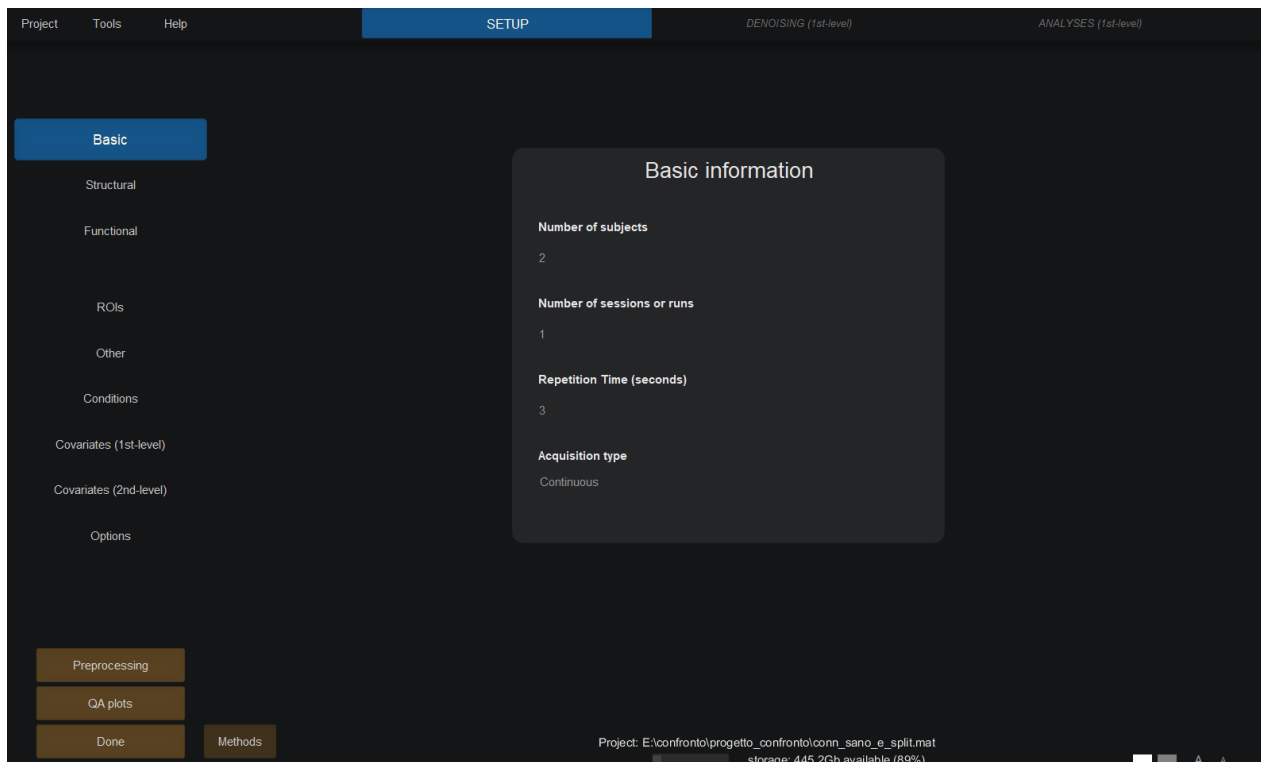


Figura 34: finestra iniziale per inserire le informazioni di set-up del progetto (CONN).

L'importazione dei dati per i due soggetti va eseguita sia per le immagini anatomiche, che per quelle funzionali, ed il corretto caricamento dei dati si può verificare dalla GUI CONN (Figure 35 e 36).

Per quanto riguarda le immagini funzionali, nella GUI vengono mostrate solo la prima (a sinistra) e l'ultima (a destra) acquisizione (Figura 35). Selezionando un particolare voxel nell'immagine funzionale è possibile visualizzare la serie temporale del voxel, ognuna contenente 300 punti (acquisizioni).

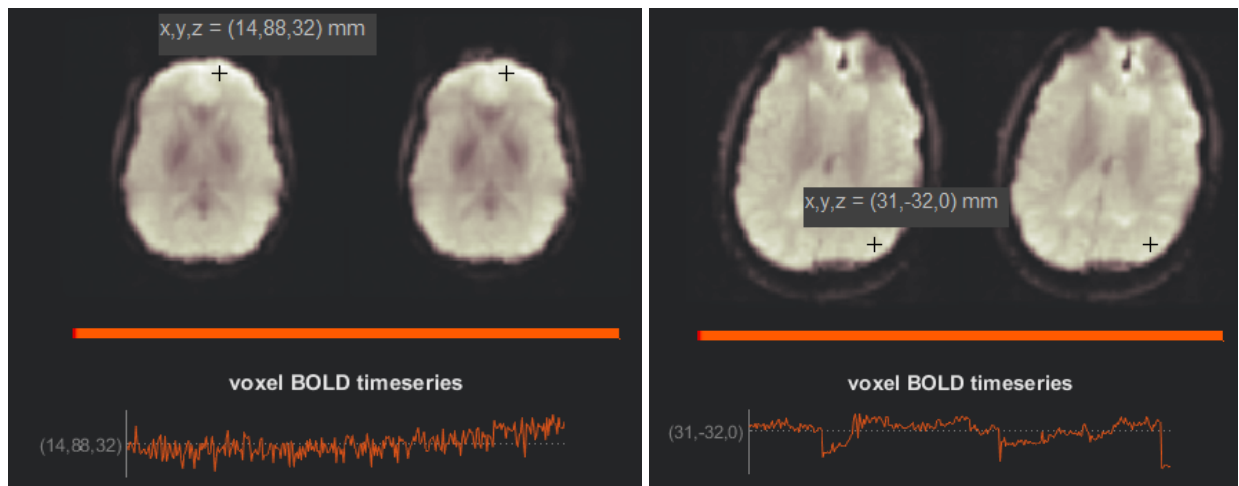


Figura 35: ingrandimento che mostra la prima e l'ultima acquisizione dei dati funzionali, e in basso, il time-series del voxel selezionato con il cursore, sano a sinistra, split brain a destra (CONN).

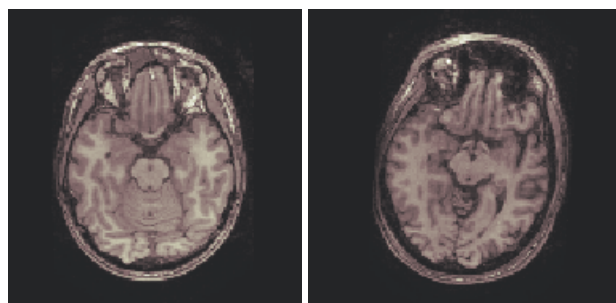


Figura 36: immagini strutturali sano a sinistra, split brain a destra (CONN).

5.3 Pre-elaborazione

I dati funzionali e anatomici sono stati pre-elaborati utilizzando una pipeline di pre-elaborazione predefinita [62] che comprende il riallineamento con correzione delle interazioni di distorsione della suscettibilità, la correzione dello slice-timing, il rilevamento degli outlier, la segmentazione diretta, la normalizzazione nello spazio MNI e lo smoothing. I dati funzionali sono stati riallineati utilizzando la procedura SPM realign & unwarp [63], in cui tutte le scansioni sono state coregistrate a un'immagine di riferimento (prima scansione della prima sessione) utilizzando un approccio ai minimi quadrati e una trasformazione a 6 parametri (corpo rigido) [64], e ricampionate utilizzando l'interpolazione b-spline per correggere le interazioni di movimento e suscettibilità magnetica. Il disallineamento temporale tra le diverse sezioni dei dati funzionali (acquisiti dal basso verso l'alto) è stato corretto seguendo la procedura SPM slice-timing correction (STC) (figura 37) [65,66], utilizzando l'interpolazione temporale sinc per ricampionare le serie temporali BOLD di ciascuna sezione a un tempo medio di acquisizione comune.

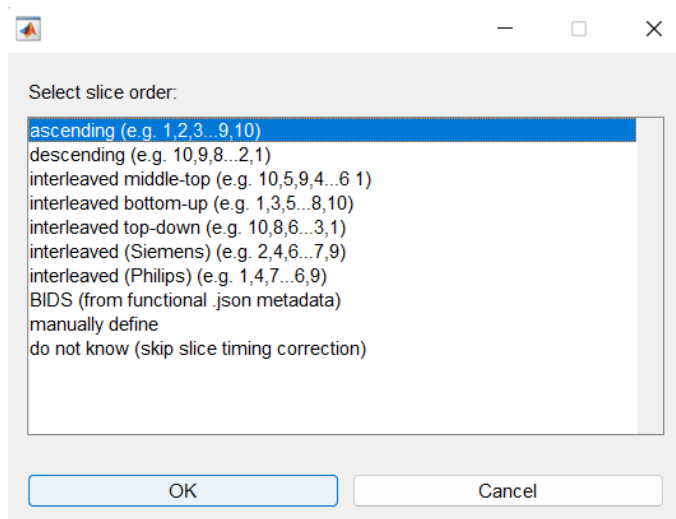


Figura 37: finestra di CONN per selezionare l'ordine di acquisizione (CONN).

Le potenziali scansioni outlier sono state identificate utilizzando ART (ARTifact detection Tools) [67], un pacchetto software con una serie di strumenti che facilitano l'identificazione dei valori outlier nelle serie temporali di fMRI. Scegliendo l'approccio "conservativo", sono state inseriti come soglia sullo spostamento framewise 0,5 mm e sulle variazioni globali del segnale BOLD 3 deviazioni standard (Figura 38) [68,69].

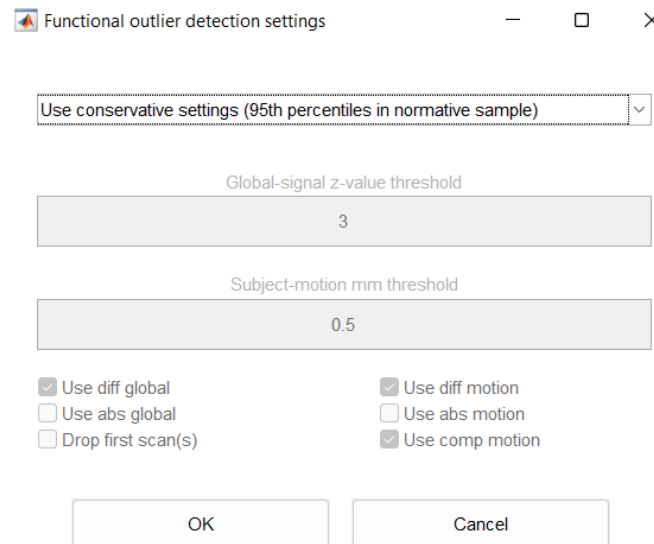


Figura 38: finestra di CONN per specificare le impostazioni sull'identificazione degli outlier (CONN).

I dati funzionali e anatomici sono stati normalizzati nello spazio MNI standard, segmentati in classi di tessuto di materia grigia, materia bianca e CSF e ricampionati in voxel isotropi di 2 mm seguendo una procedura di normalizzazione diretta (Figura 39) [69,70] utilizzando l'algoritmo di segmentazione e normalizzazione unificato SPM [71,72] con il modello di mappa di probabilità tissutale IXI-549 predefinito.

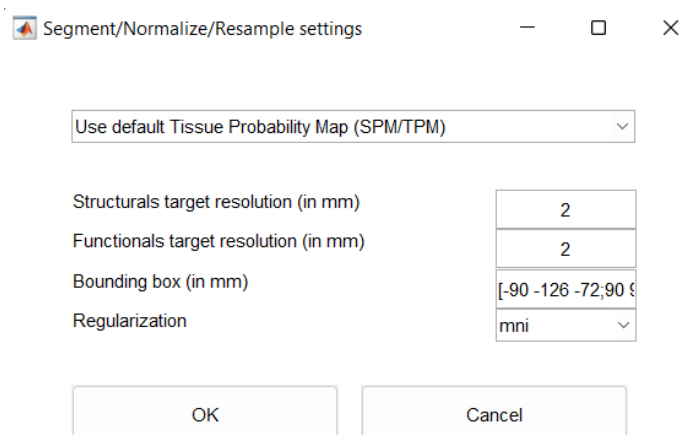


Figura 39: finestra di CONN per specificare le impostazioni su segmentazione, normalizzazione e ricampionamento (CONN).

Infine, i dati funzionali del soggetto sano sono stati smussati mediante convoluzione spaziale con un kernel gaussiano di 5 mm di larghezza massima (FWHM) (Figura 40). Per le analisi di un singolo soggetto dovrebbero essere applicate solo dimensioni di filtro modeste (circa 5 mm), mentre per le analisi multi-soggetto sono ragionevoli filtri più ampi per tenere conto della variabilità intersoggetto (circa 6-10 mm).

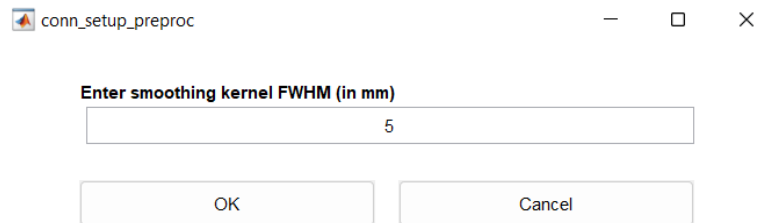


Figura 40: finestra di CONN per impostare lo smoothing sul soggetto sano (CONN).

Una volta terminata la fase di preprocessamento dei dati è consigliato esplorare i file usciti dall'elaborazione. È possibile verificare la corretta esecuzione del processo confrontando le immagini funzionali tramite il pulsante 'functional tools' -> 'display single-slice for all subjects'. Dalla Figura 41 si nota che le sezioni dei due soggetti sono mostrate rispetto alla stessa coordinata $Z=18$ quindi risultano confrontabili e la normalizzazione è avvenuta con successo.

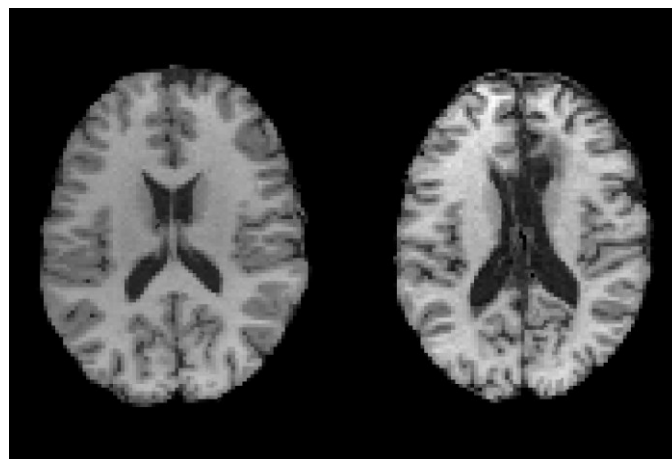


Figura 41: immagini anatomiche dei due soggetti (sano sinistra, split brain destra) visualizzate dopo il preprocessamento per valutare la normalizzazione (CONN).

Un'alternativa per valutare la correttezza del pre-processing è uno strumento disponibile in 'functional tools', 'slice viewer with MNI boundaries': i confini MNI dovrebbero rappresentare il 25% dello spazio in cui dovrebbe esserci materia grigia se il cervello fosse normalizzato correttamente nello spazio MNI, perciò, si dovrebbe osservare una buona corrispondenza tra i confini MNI e la materia grigia. Gli stessi controlli possono essere applicati ai dati anatomici.

Come già detto sopra, il pulsante 'QA plots' fornisce un ulteriore metodo che permette all'utente di visualizzare i controlli da lui selezionati. Per la nostra analisi sono stati generati i seguenti grafici predefiniti da CONN: Figura 42, Figura 43, Figura 44, Figura 45 e Figura 46.

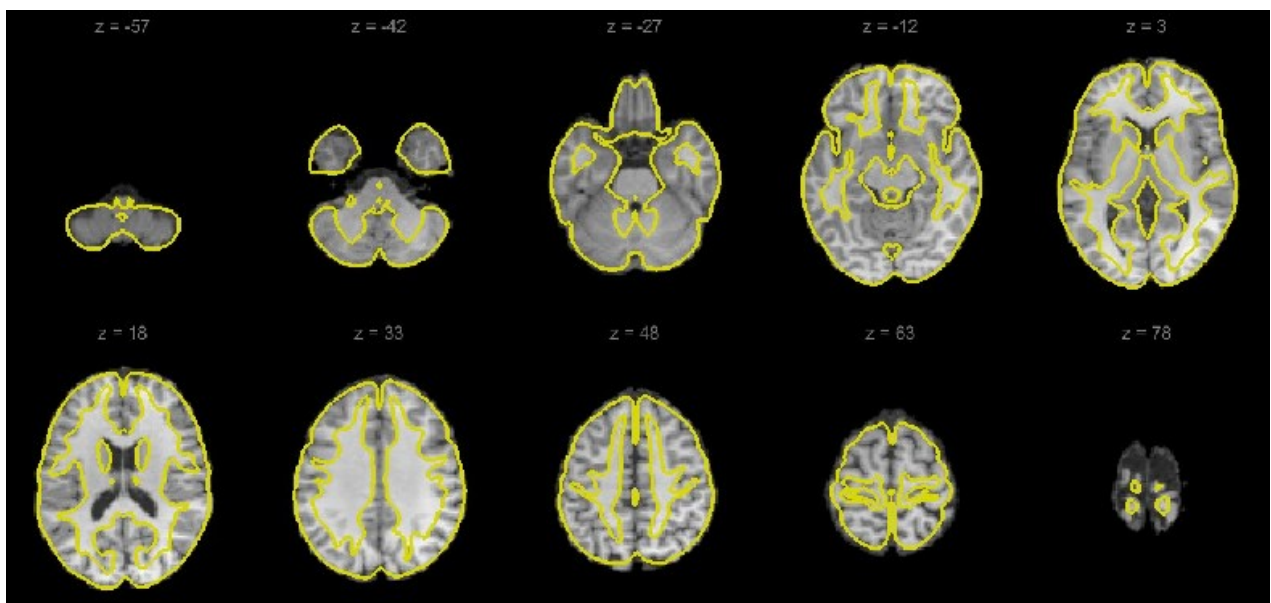


Figura 42: grafico QA dei dati anatomici normalizzati con contorni delle TPM individuate nello spazio MNI, soggetto sano (CONN).

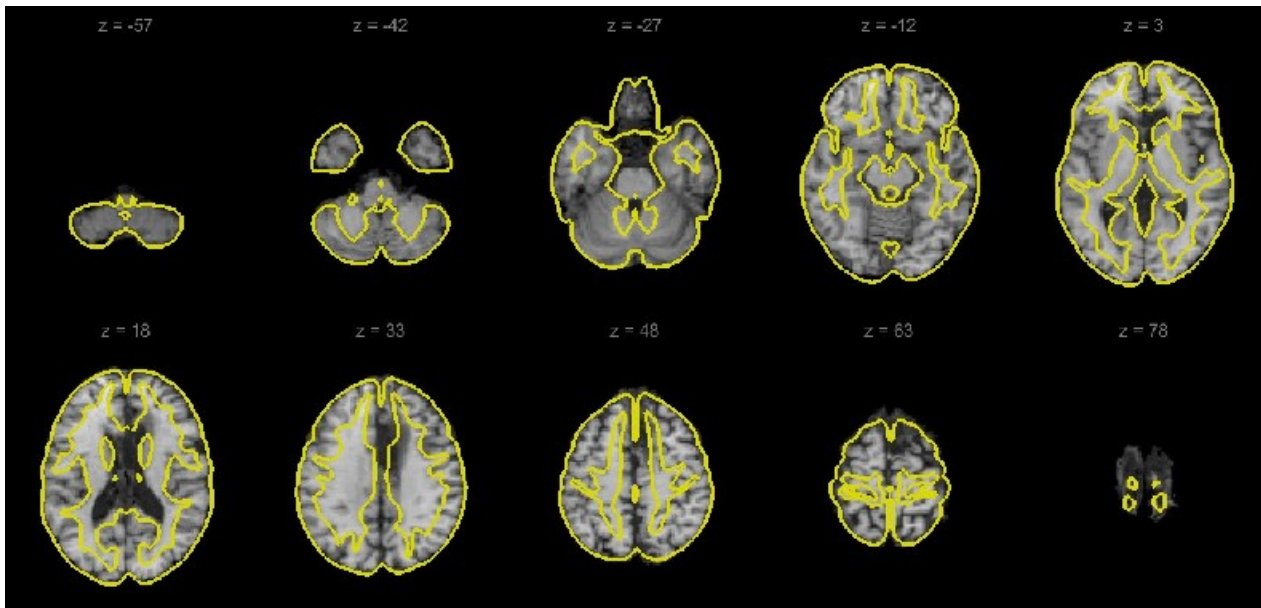


Figura 43: grafico QA dei dati anatomici normalizzati con contorni delle TPM individuate nello spazio MNI, soggetto split brain (CONN).

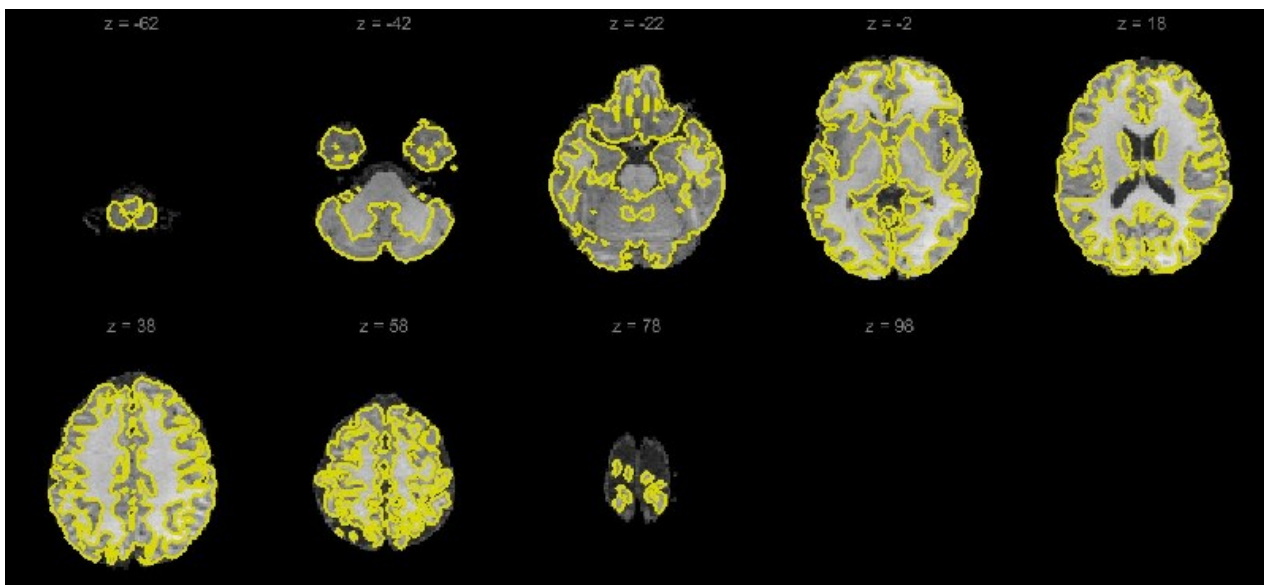


Figura 44: grafico QA dei dati anatomici dopo la registrazione con contorni delle regioni contenenti materia grigia, soggetto sano (CONN).

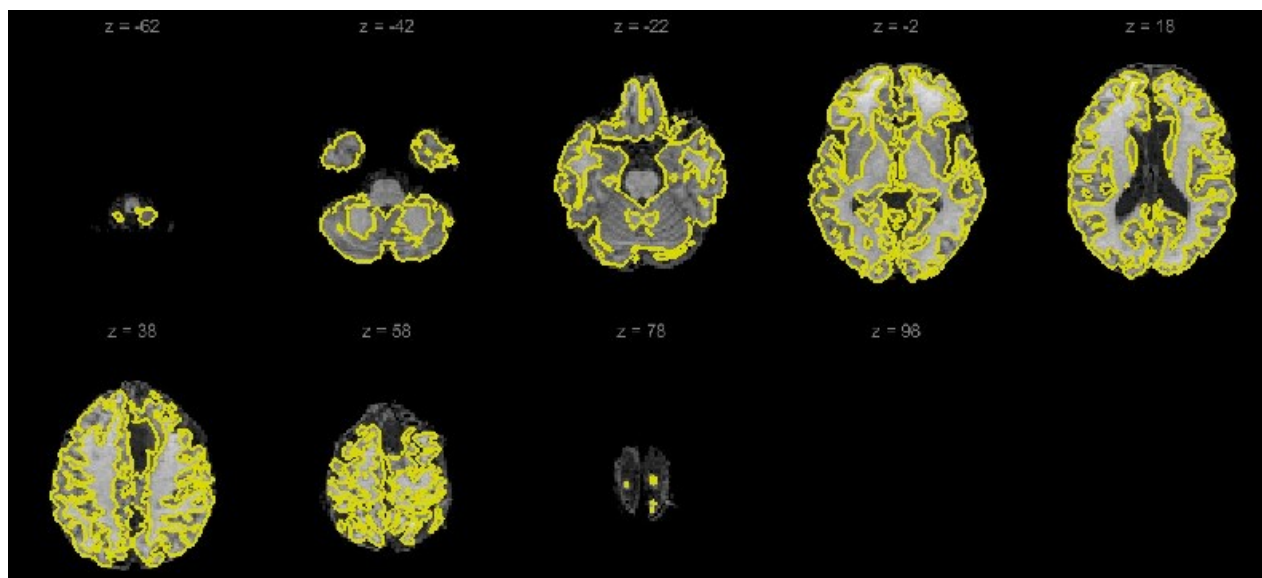


Figura 45: grafico QA dei dati anatomici dopo la registrazione con contorni delle regioni contenenti materia grigia, soggetto split brain (CONN).

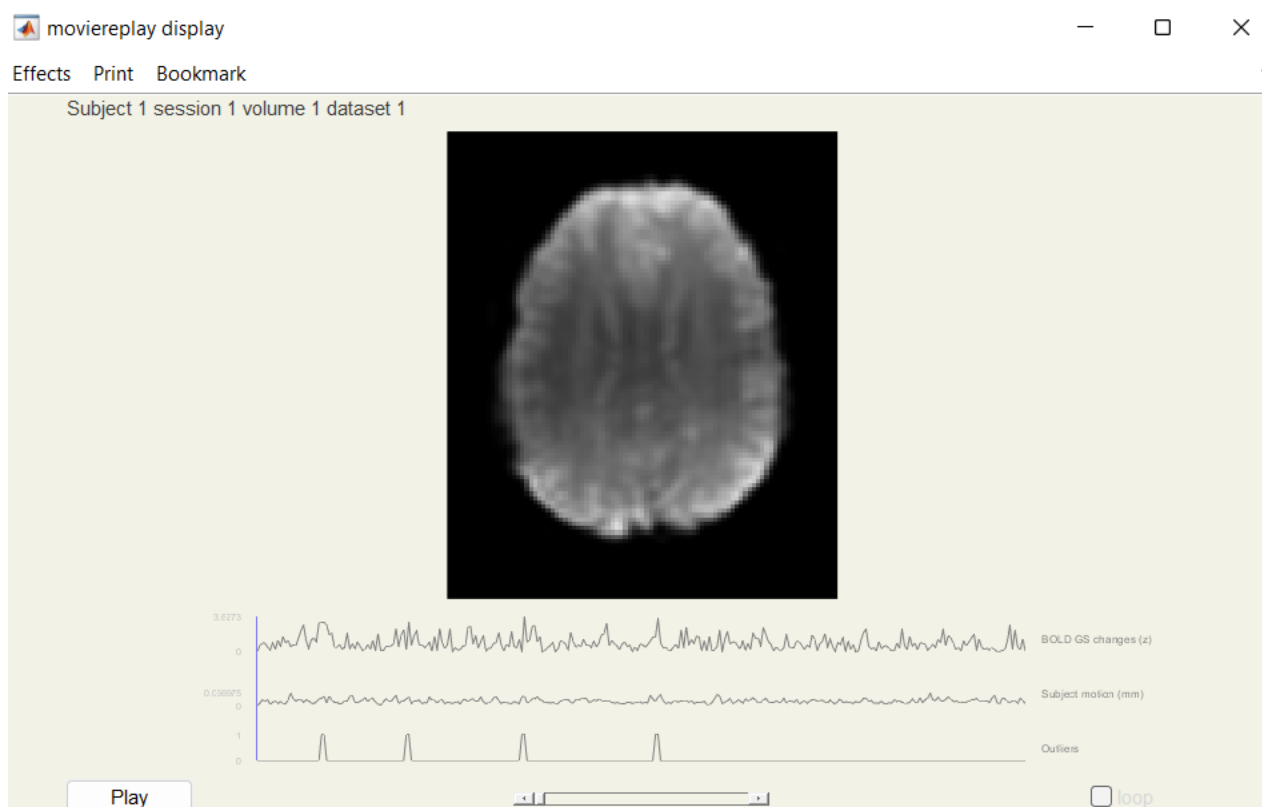


Figura 46: grafico QA sugli artefatti che mostra le variazioni del segnale BOLD globale e le serie temporali di movimento del soggetto sano (CONN).

Dopo il preprocessing nella GUI CONN sono disponibili tre nuove risorse: le ROIs, le covariate di primo livello e le covariate di secondo livello.

Le ROIs create da CONN automaticamente per ogni soggetto sono tre e contengono i tre tessuti, materia bianca, materia grigia e CSF, individuati durante la segmentazione (Figura 47).

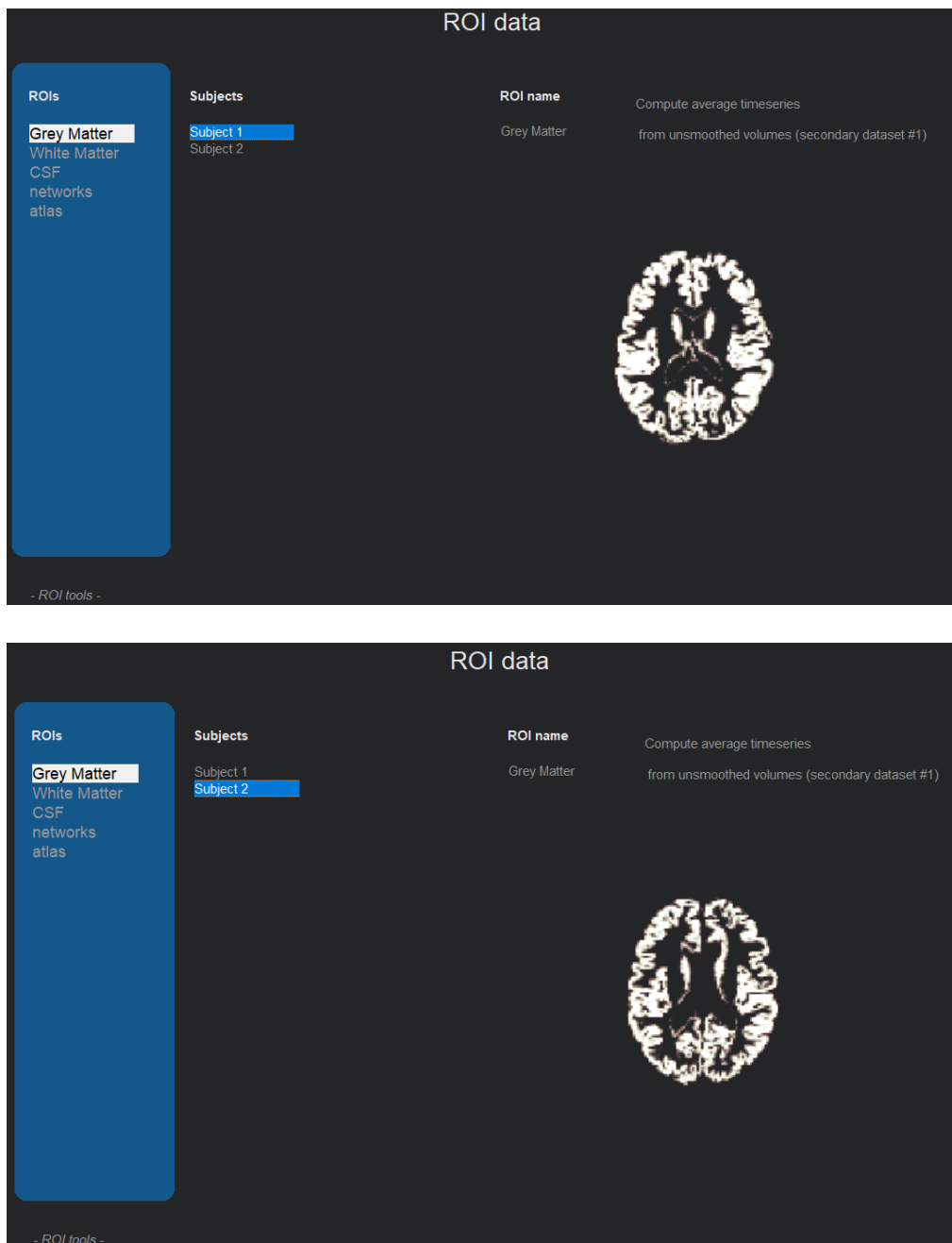


Figura 47: finestra selezionabile solo al termine del preprocessing in cui possono essere visualizzate le regioni di interesse, sopra la materia grigia del soggetto sano e sotto del soggetto split brain.

Oltre a questi tre tessuti, CONN classifica di default come ROIs anche gli atlas (Figura 48) e le networks (Figura 49), aspecifiche per ogni soggetto, ma presenti nello spazio MNI.

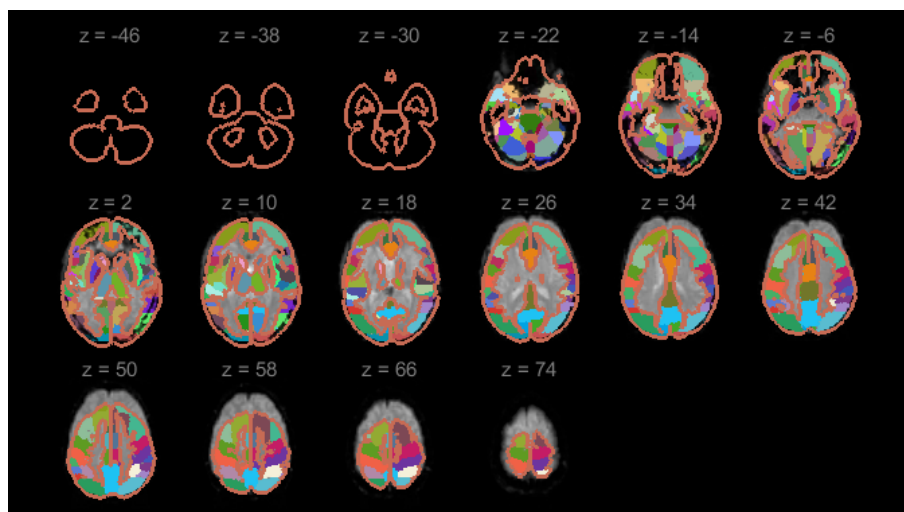
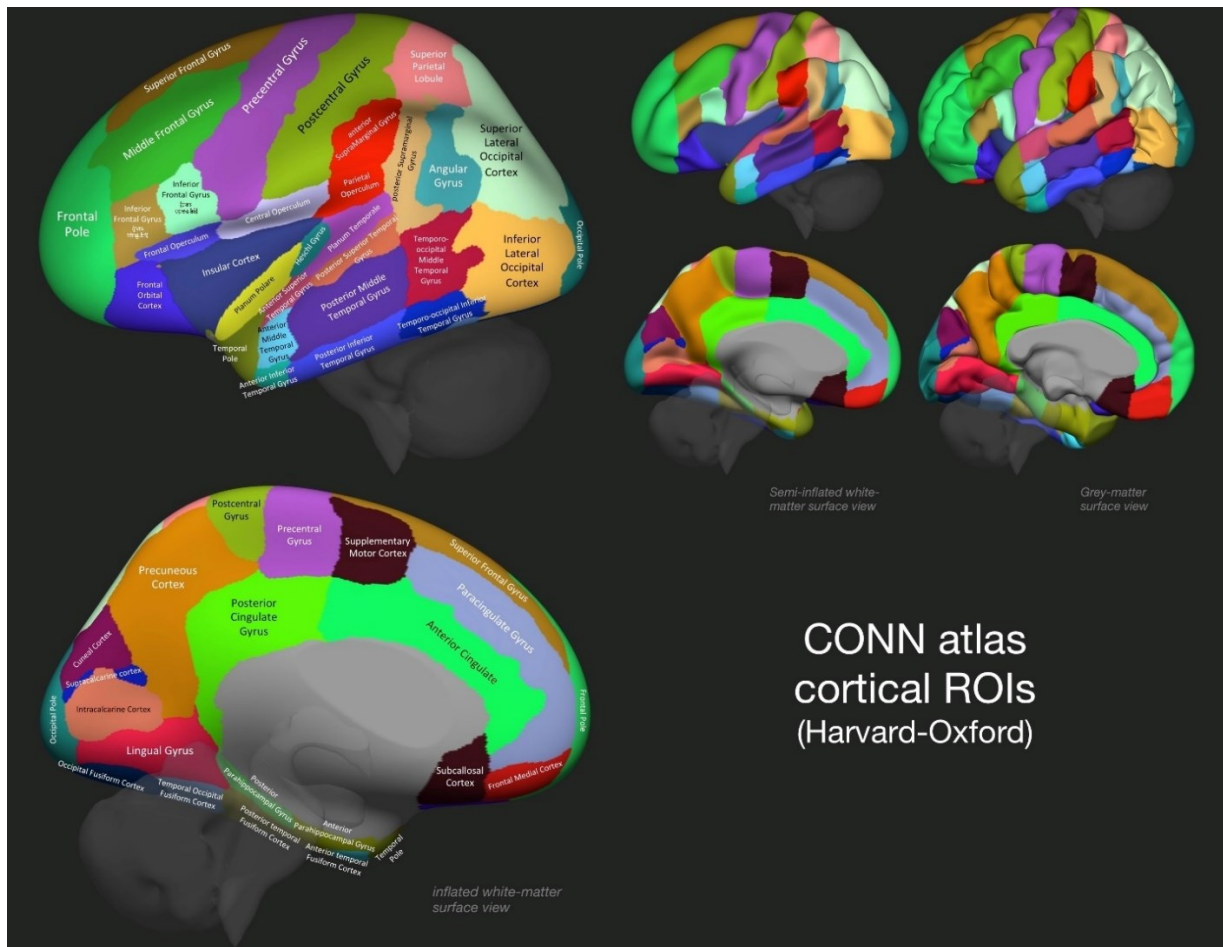


Figura 48: parcellizzazione Default degli atlas in CONN

FSL Harvard-Oxford atlas (CONN).

Gli atlanti probabilistici in Figura 48 coprono 48 aree strutturali corticali e 21 subcorticali e sono derivati da dati strutturali e segmentazioni forniti dall'Harvard Center for Morphometric Analysis.

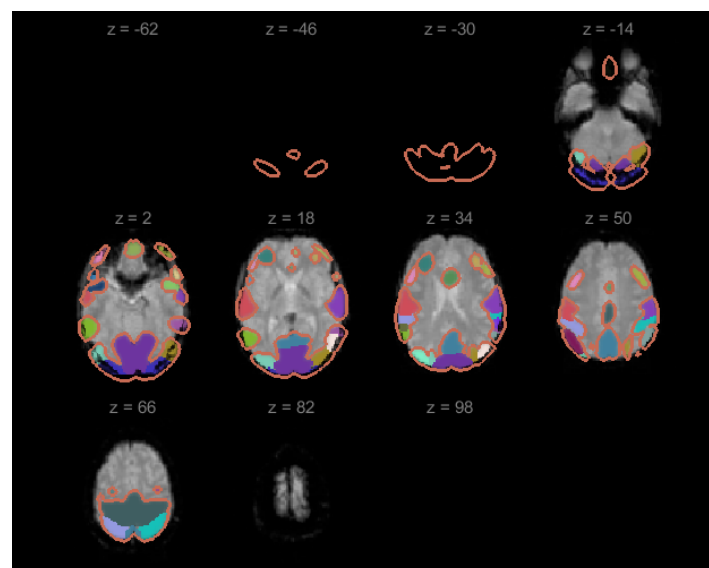
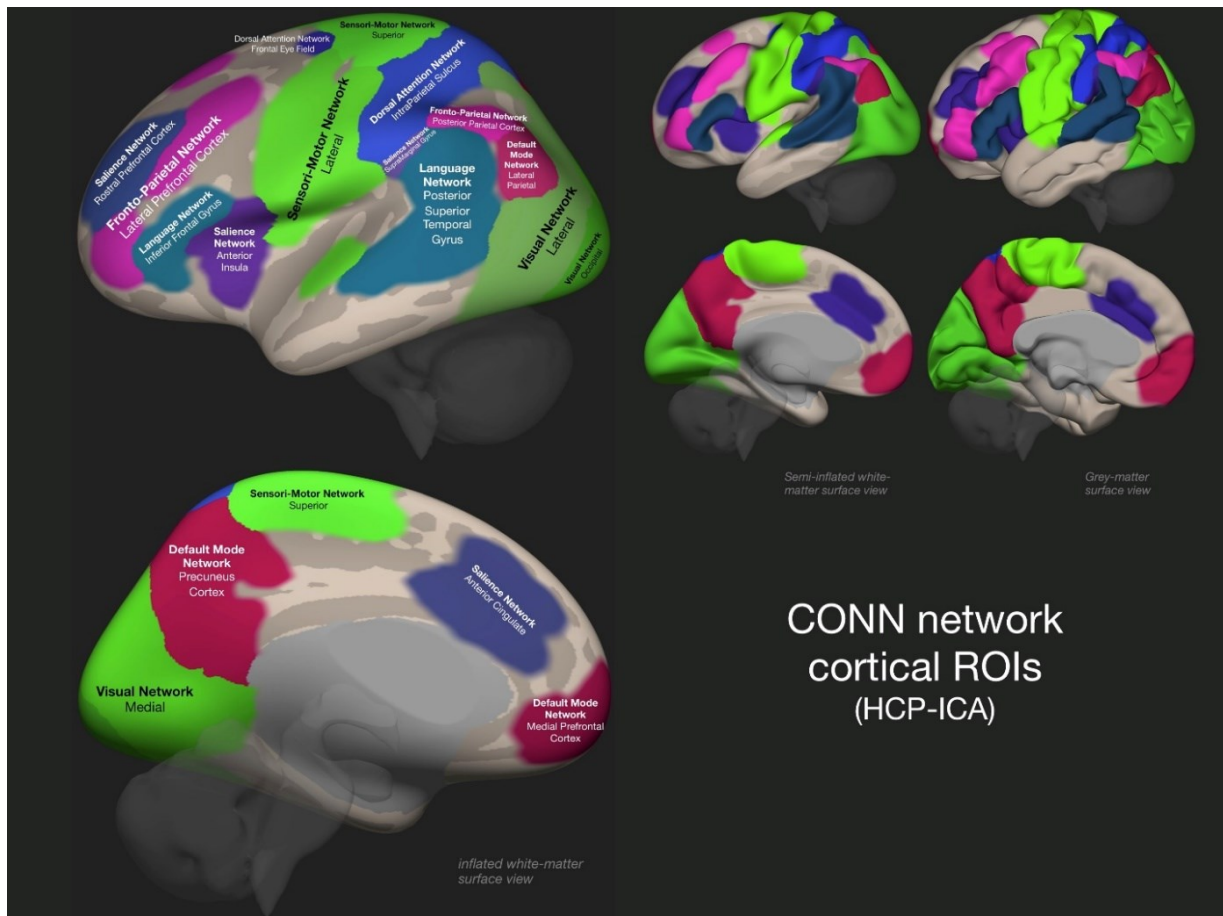


Figura 49: parcellizzazione Default in CONN delle ROIs estratte dalle networks ottenute dall'analisi ICA del dataset HCP (n=497) (CONN).

Le RSNs in Figura 49 sono state definite utilizzando modelli di analisi dei componenti indipendenti (ICA) convalidati dall'HCP (Human Connectome Project), un progetto lanciato nel 2010 e finanziato da NIH (National Institute of Health). Nato da uno sforzo ambizioso per accelerare i progressi nel neuroimaging umano, in particolare per le misure di connettività, applica questi progressi nello studio di un gran numero di giovani e adulti sani e condivide liberamente i dati e gli strumenti con la comunità scientifica.

Come anticipato, le covariate di primo livello sono tre: realignment, QC_timeseries, scrubbing.

In Figura 50 è riportata la covariata ‘realignment’ che consiste di una serie temporale rappresentante quanto il soggetto si sia mosso nello scanner.

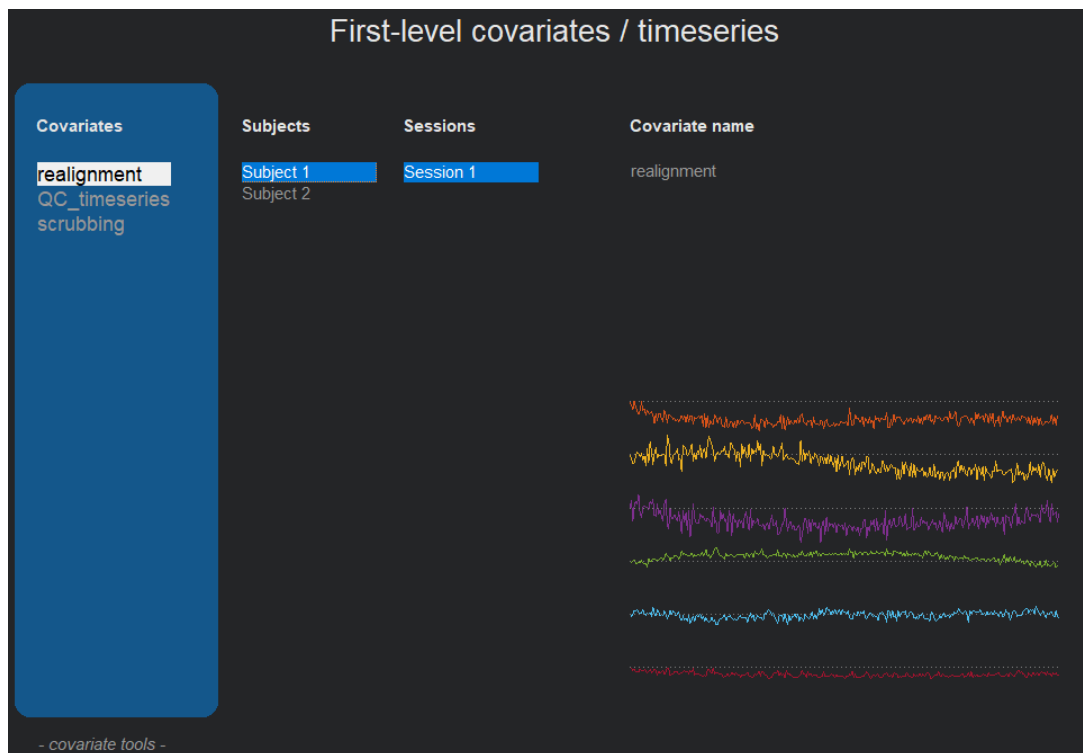


Figura 50: finestra che mostra la covariata di primo livello “realignment” del soggetto sano (CONN).

5.4 Denoising

Selezionando ‘DENOISING (1st-level)’ si apre la finestra di denoising in Figura 51. A sinistra, il riquadro ‘Denoising settings’, elenca i regressori di confondimento utilizzati per tenere conto delle diverse fonti di rumore, mentre la finestra a destra, ‘Preview effect of Denoising’, mostra la quantità di segnale provocata da ciascun regressore.

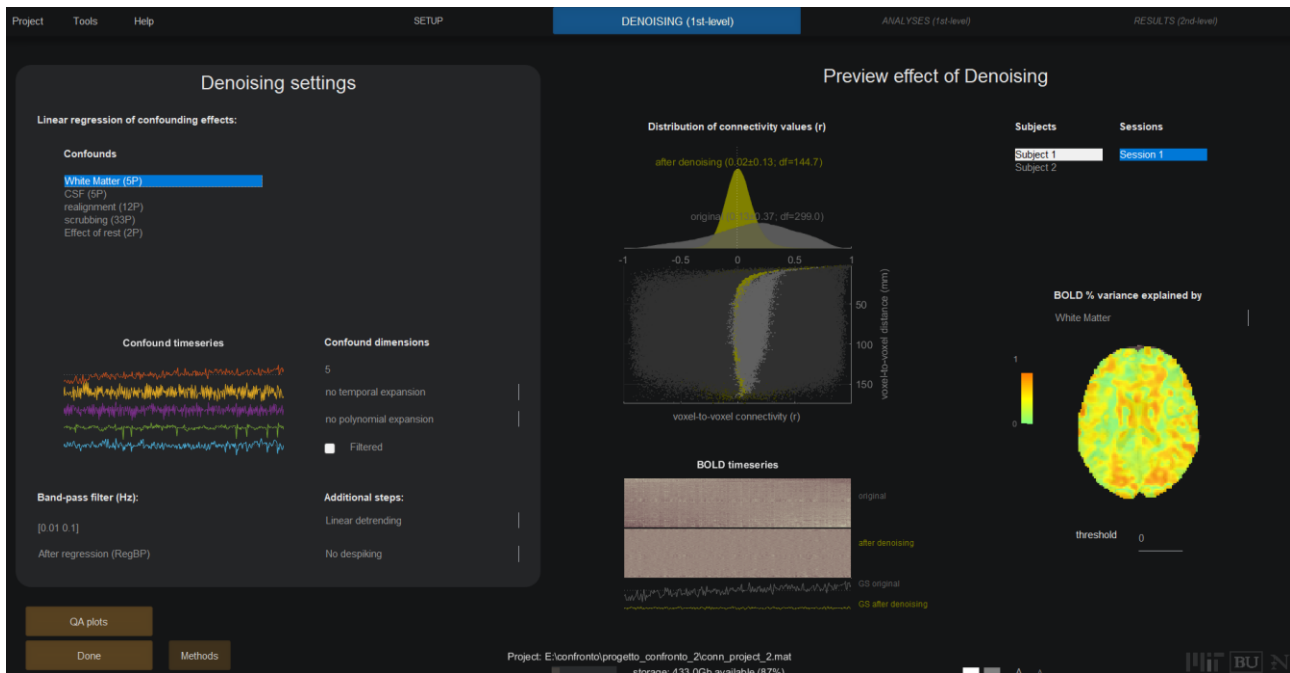


Figura 51: finestra di CONN di denoising in cui a sinistra è presente un elenco di regressori di confondimento, a destra, l'effetto dell'inclusione di quei regressori nel segnale BOLD (CONN).

Gli effetti di confondimento globali sono stati eliminati con ‘anatomical CompCor’, in grado di estrarre del segnale rumoroso dalle regioni selezionate, cioè materia bianca e CSF, e rimuovere tutto ciò che è correlato a queste componenti di rumore dal segnale BOLD per ogni voxel. Dai dati funzionali è stata eliminata una gran parte del rumore utilizzando una pipeline di denoising standard [73] che include la regressione dei potenziali effetti di confondimento caratterizzati da serie temporali di materia bianca (5 componenti di rumore CompCor), serie temporali di CSF (5 componenti di rumore CompCor), parametri di movimento (3 traslazioni e 3 rotazioni) e le loro derivate prime [74], scansioni anomale (inferiori a 33 fattori) [68], effetti di sessione e le loro derivate prime e tendenze lineari (2 fattori), seguiti da un filtraggio di frequenza passa-banda delle serie temporali BOLD [75] tra 0,01 e 0,1 Hz (Figura 52). Le componenti di rumore CompCor [76,77] all'interno della materia

bianca e del liquor sono state stimate calcolando il segnale BOLD medio. Dal numero di termini di rumore inclusi in questa strategia di denoising, i gradi di libertà effettivi del segnale BOLD dopo il denoising sono stati stimati tra 130,1 e 144,7 (media 137,4) in entrambi i soggetti [69].

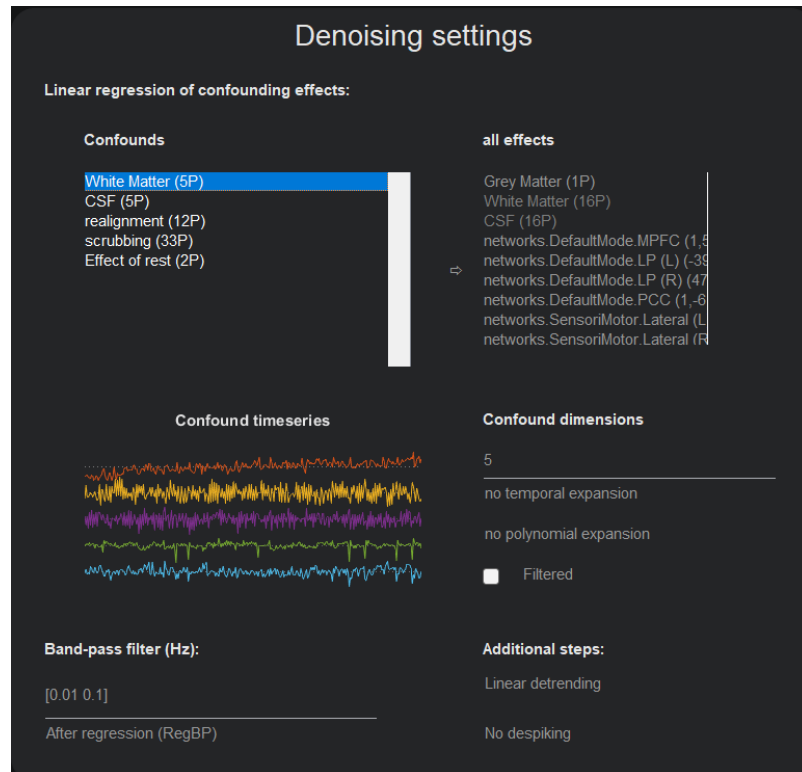


Figura 52: finestra ‘Denoising settings’ dove compaiono gli effetti di confondimento sul soggetto sano (CONN).

Osservando i dati in uscita dal pre-processing riguardanti il segnale BOLD tra diversi voxels, sui quali è stata effettuata una correlazione funzionale tra ogni coppia, e rappresentando su un istogramma la distribuzione di queste correlazioni, si ottiene la curva grigia visibile nella Figura 51 in alto a destra. Tale distribuzione (Figura 53) mostra che la maggior parte dei voxels sono altamente correlati tra loro. Alcuni degli effetti residui sono globali sono legati ad ogni soggetto, e quando questi effetti sono tanto significativi da influenzare il segnale BOLD, le misure di correlazione funzionale riporteranno un elevato bias che nasconderà l’obiettivo del progetto di individuare la connettività funzionale. In seguito al processo di denoising, la distribuzione risulta più centrata intorno allo zero.

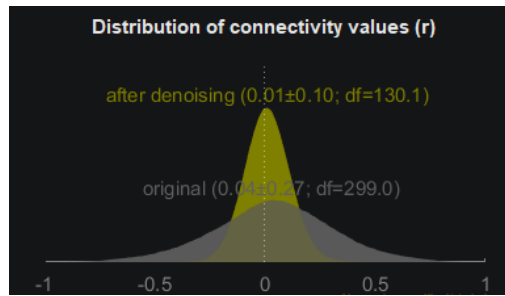


Figura 53: distribuzione della connettività tra coppie di voxels prima (curva grigia) e dopo il denoising (curva verde) del soggetto split brain (CONN).

Per valutare il processo di denoise è presente anche il ‘carpet plot’, il quale riporta la serie temporale del segnale BOLD nei vari voxels in Figura 54. Il grafico è suddiviso in un pattern superiore dove è illustrato il segnale originale, in cui sono presenti alcuni effetti residui globali, e una parte inferiore, composta da un pattern più uniforme ottenuto dopo il denoising.



Figura 54: grafico a tappeto che mostra gli effetti del denoising sul segnale BOLD globale, soggetto split brain (CONN).

5.5 Analisi di primo livello: connettività funzionale

La prima tecnica utilizzata per effettuare l’analisi di primo livello è la seed-based correlation (SCA). Nella schermata ‘first-level Analysis’, sono richieste delle specifiche sul tipo di analisi, tra cui la selezione dei seeds, cioè le regioni interessanti che saranno confrontate con i voxels dell’intero cervello. Per questo studio sono stati scelti come seeds a priori tutte le reti predefinite in CONN: DMN (4 ROIs), FPN (4 ROIs), SN (7 ROIs), DAN (4 ROIs), LN (4 ROIs), VN (4 ROIs), SMN (3 ROIs) e CN (2 ROIs). Le mappe spaziali delle 8 RSNs e le coordinate di 32 ROIs sono descritte in Tabella 2.

<i>MNI Coordinates</i>				
<i>Name of RSNs</i>	Regions of Interests (ROIs)	x	y	z
<i>Default mode network (DMN)</i>	Medial prefrontal cortex (MPFC)	1	55	-3
	Left lateral parietal (LLP)	-39	-77	33
	Right lateral parietal (rLP)	47	-67	29
	Posterior cingulate cortex (PCC)	1	-61	38
<i>Sensorimotor network (SMN)</i>	Left precentral gyrus (lPrG)	-55	-12	29
	Right precentral gyrus (rPrG)	56	-10	29
	Middle cingulate cortex (MCC)	0	-31	67
<i>Visual network (VN)</i>	Lingual gyrus (LING)	2	-79	12
	Calcarine sulcus (CAL)	0	-93	-4
	Left middle occipital gyrus (lMOG)	-37	-79	10
	Right middle occipital gyrus (rMOG)	38	-72	13
<i>Salience network (SN)</i>	dorsal Anterior cingulate cortex (dACC)	0	22	35
	Left anterior insula (lAI)	-44	13	1
	Right anterior insula (rAI)	47	14	0
	Left rostral prefrontal cortex (lRPFC)	-32	45	27
	Right rostralprefrontal cortex (rRPFC)	32	46	27
	Left supramarginal Gyrus (lSMG)	-60	-39	31
	Right supramarginal Gyrus (rSMG)	62	-35	32
<i>Dorsal Attention Network (DAN)</i>	Left frontal eye field (lFEF)	-27	-9	64
	Right frontal eye field (rFEF)	30	-6	64
	Left intraparietal sulcus (lIPS)	-39	-43	52
	Right intraparietal sulcus (rIPS)	39	-42	54
<i>Frontoparietal network (FPN)</i>	Left lateral prefrontal cortex(lLPFC)	-43	33	28
	Right lateral prefrontal cortex(rLPFC)	41	38	30
	Left posterior parietal cortex (lPPC)	-46	-58	49
	Right posterior parietal cortex (rPPC)	52	-52	45
<i>Language network (LN)</i>	Left inferior frontal gyrus (lIFG)	-51	26	2
	Right inferior frontal gyrus (rIFG)	54	28	1
	Left posterior superior temporal gyrus (lpSTG)	-57	-47	15
	Right posterior superior temporal gyrus (rpSTG)	59	-42	13
<i>Cerebellar network (CN)</i>	Cerebellar anterior lobules (Anterior)	0	-63	-30
	Cerebellar posterior lobule (Posterior)	0	-79	-32

Tabella 2: Coordinate del Montreal Neurological Institute (MNI) di 32 ROIs nelle resting state networks [81].

Dalla SCA si ottiene la possibilità di visualizzare la finestra “Analysis (1-st-level)” riportata in Figura 55 e in dettaglio la correlazione tra seeds in Figura 56.

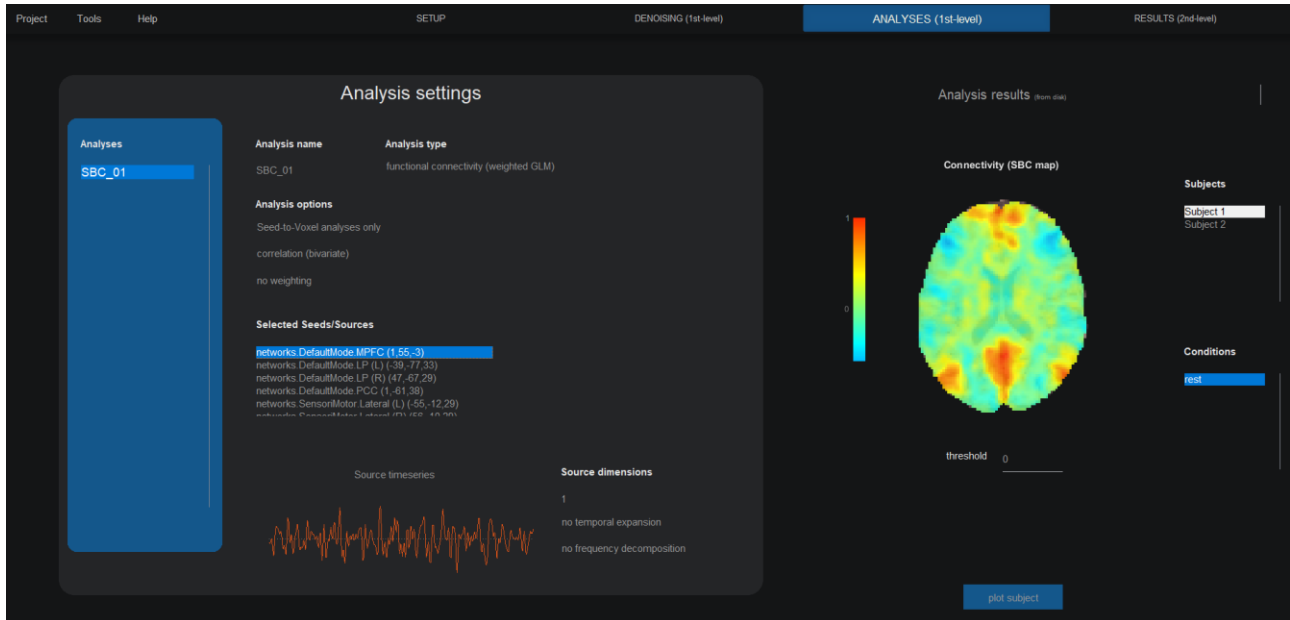


Figura 55: finestra dell’analisi di primo livello di tipo SCA in cui è mostrata la mappa di connettività seed-based selezionando la DMN.MPFC come seed per il soggetto sano con soglia pari a 0 (CONN).

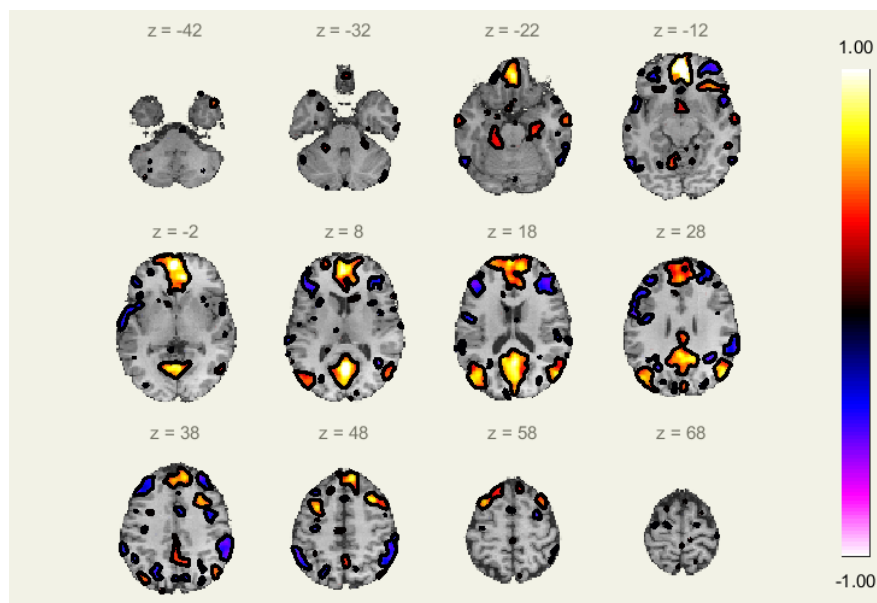


Figura 56: Risultati dell’analisi SCA sopra del soggetto sano con soglia pari a 0,25.

5.6 Risultati

In seguito, sono riportati i risultati della SCA per alcune delle ROIs selezionate, sia per il soggetto sano che per il paziente split brain. Le ROIs che si è scelto di mostrare corrispondono alle aree in cui per entrambi i soggetti è stata rilevata una maggiore connettività interemisferica. Nelle Figure 57-63 il soggetto sano è riportato in alto, mentre il soggetto split brain in basso. Come detto in precedenza, il toolbox suddivide ogni rete in più regioni (Tabella 2). Le figure seguenti mostrano un confronto tra le ROIs sinistre (riportate a sinistra) e destre (riportate a destra) di alcune delle reti individuate da CONN, rappresentate secondo la convenzione neurologica.

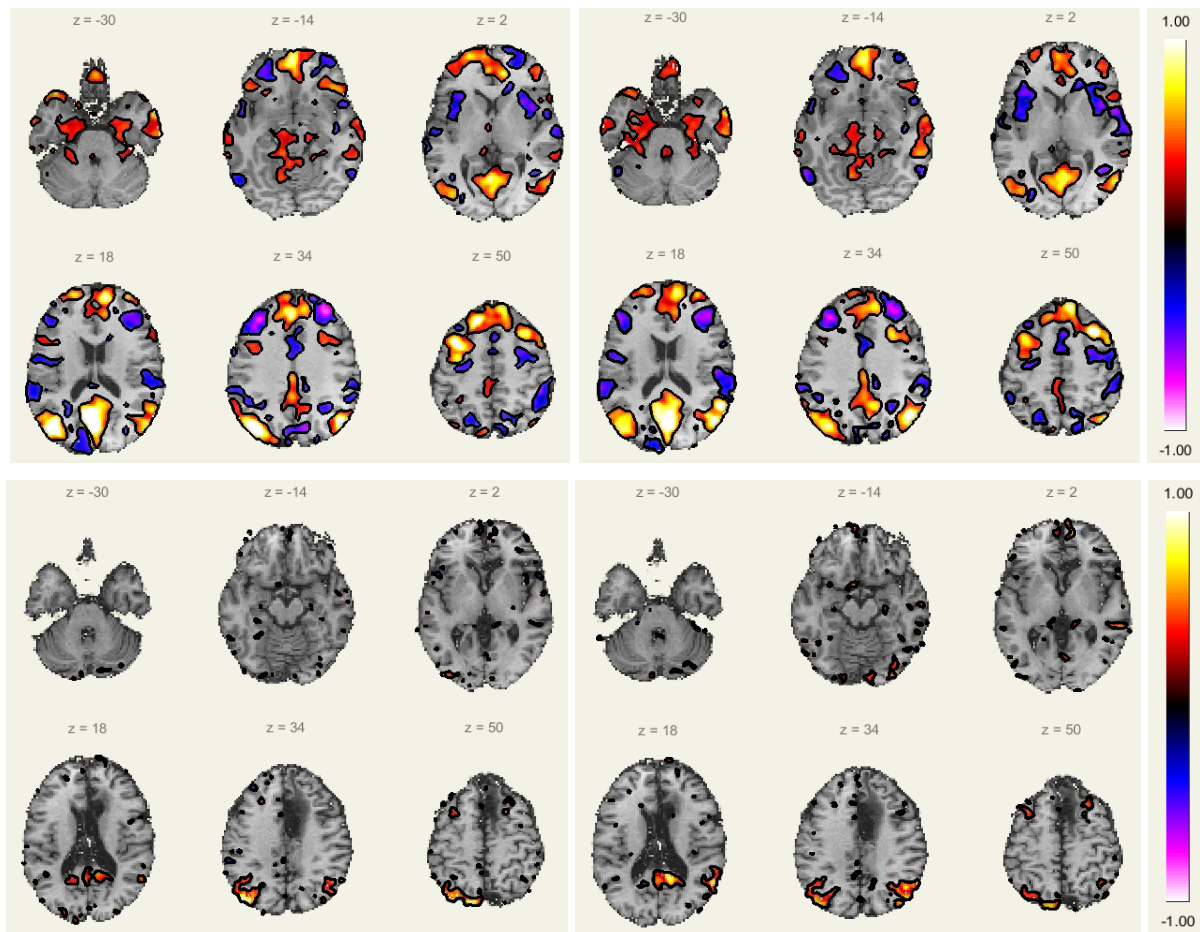


Figura 57: Default Mode Network lateral parietal (DMN.LP) left (a sinistra) and right (a destra) sano (sopra) e split brain (sotto).

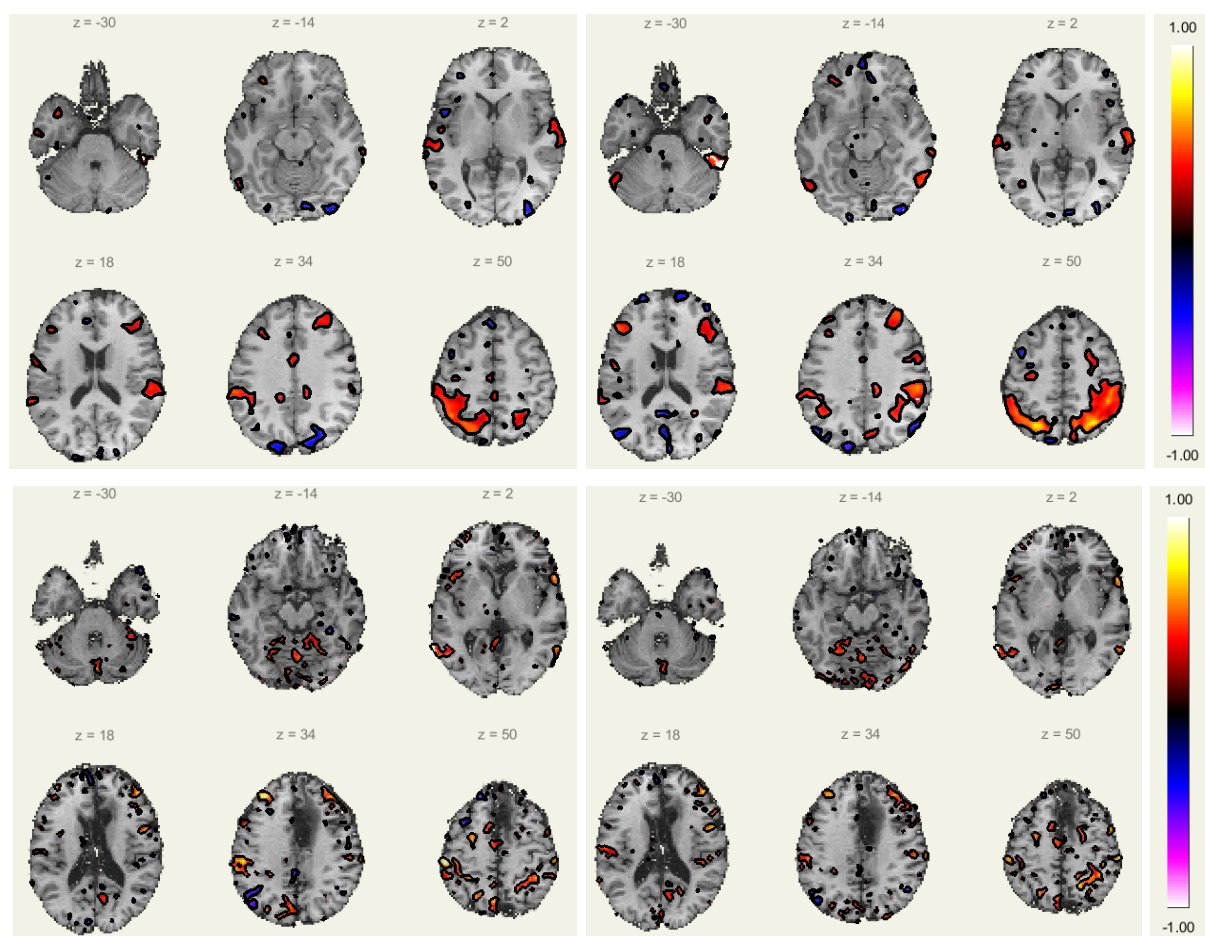


Figura 58: Dorsal Attention Network intraparietal sulcus (DAN.IPS) left (a sinistra) and right (a destra) sano (sopra) split brain (sotto).

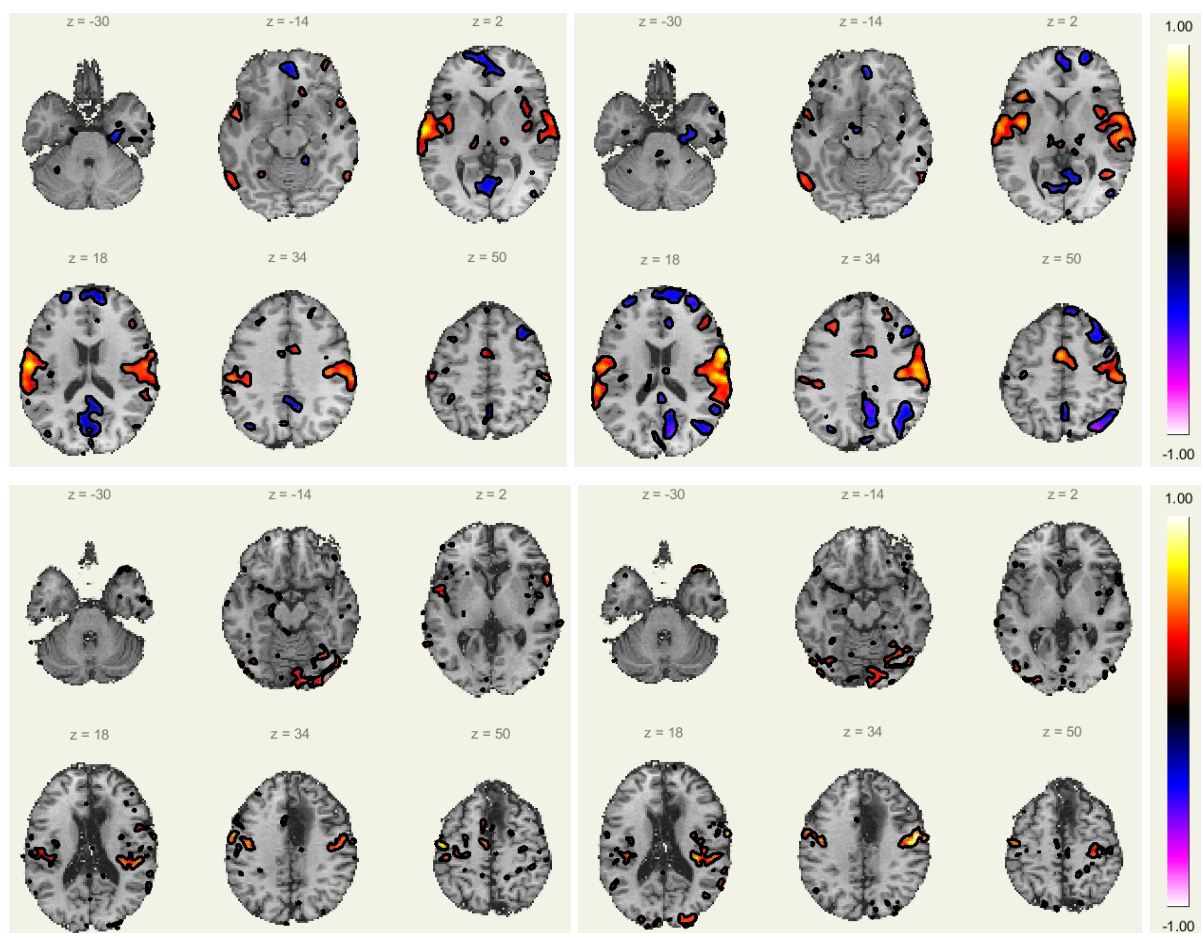


Figura 59: Sensorimotor Lateral left (a sinistra) and right (a destra) sano (sopra) split brain (sotto).

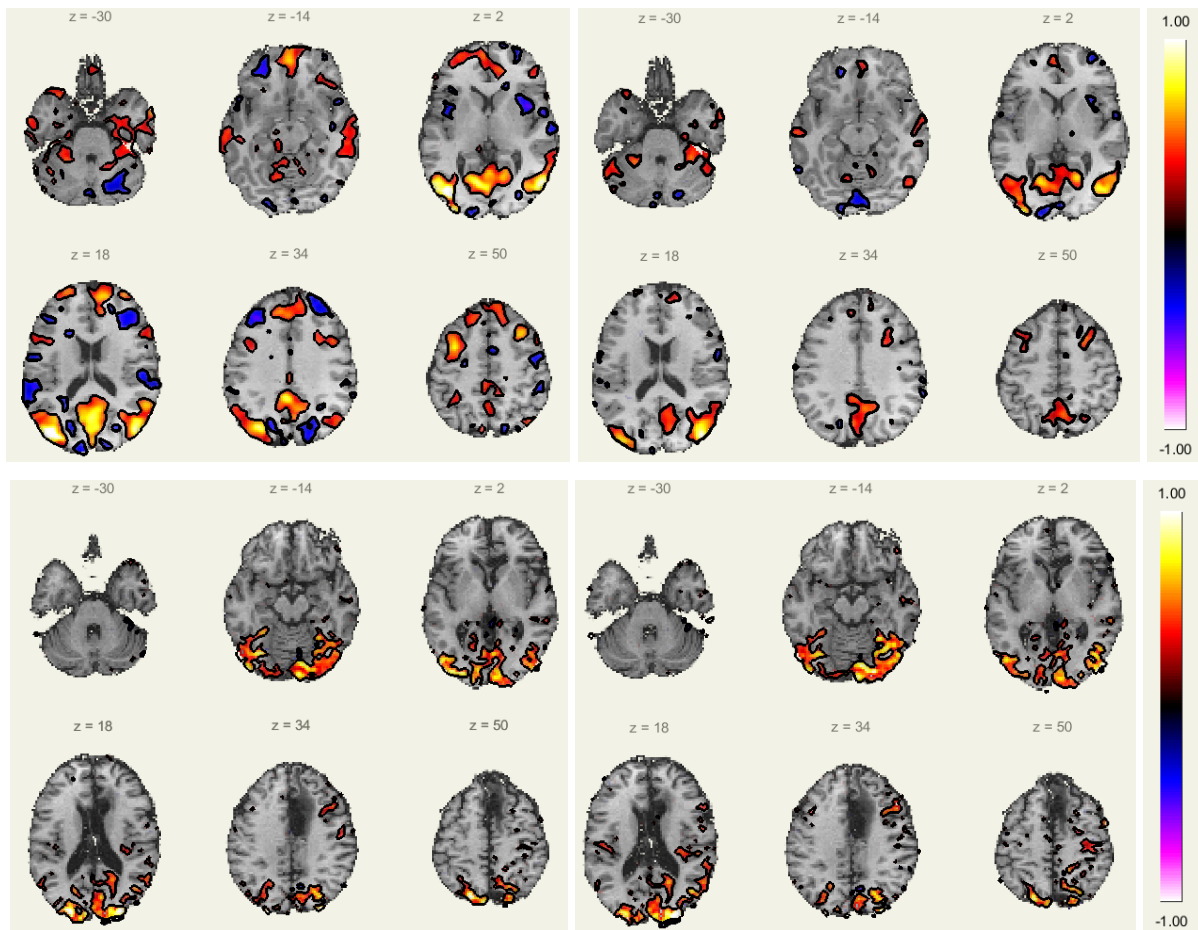


Figura 60: Visual Network Lateral sano (sopra) split brain (sotto).

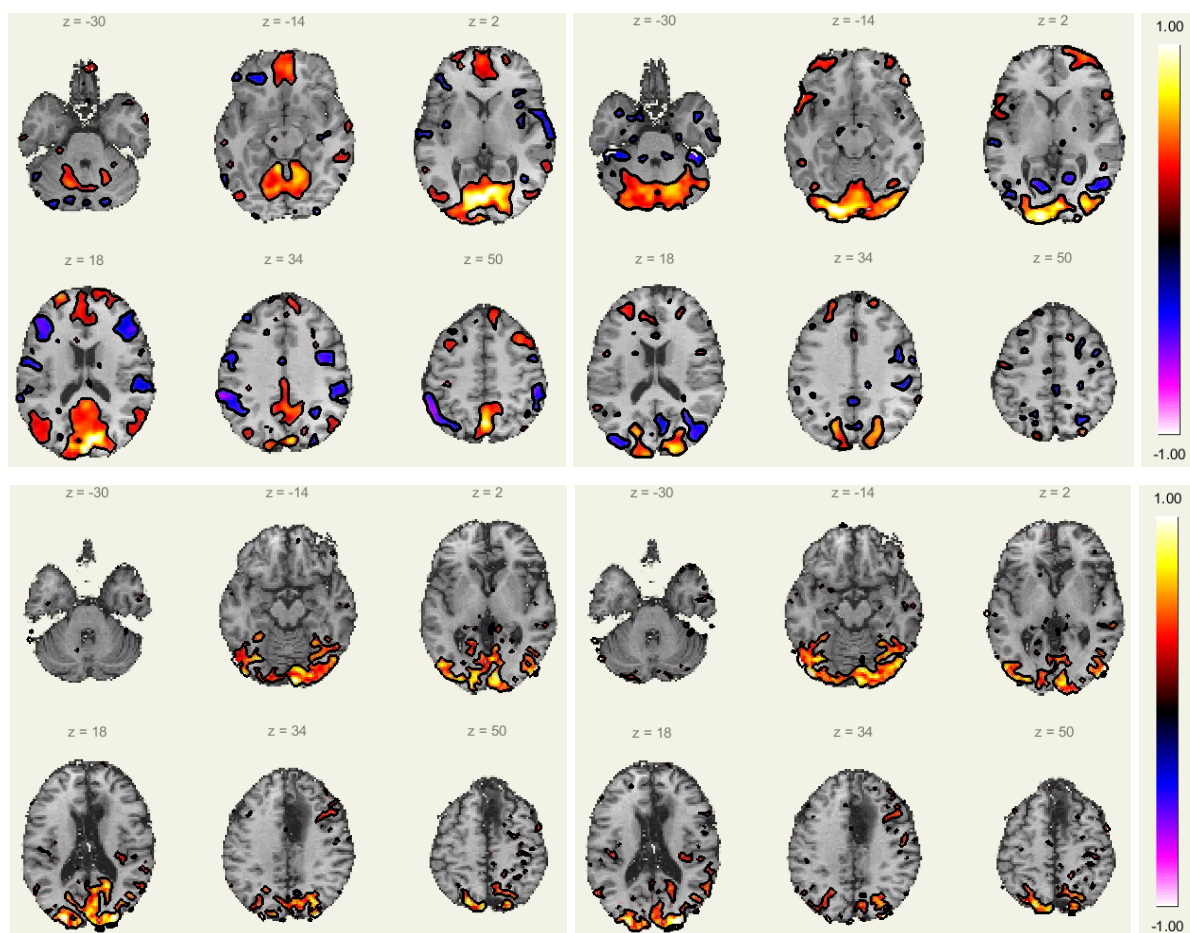


Figura 61: Visual Network Medial (a sinistra) Occipital (a destra) sano (sopra) split brain (sotto).

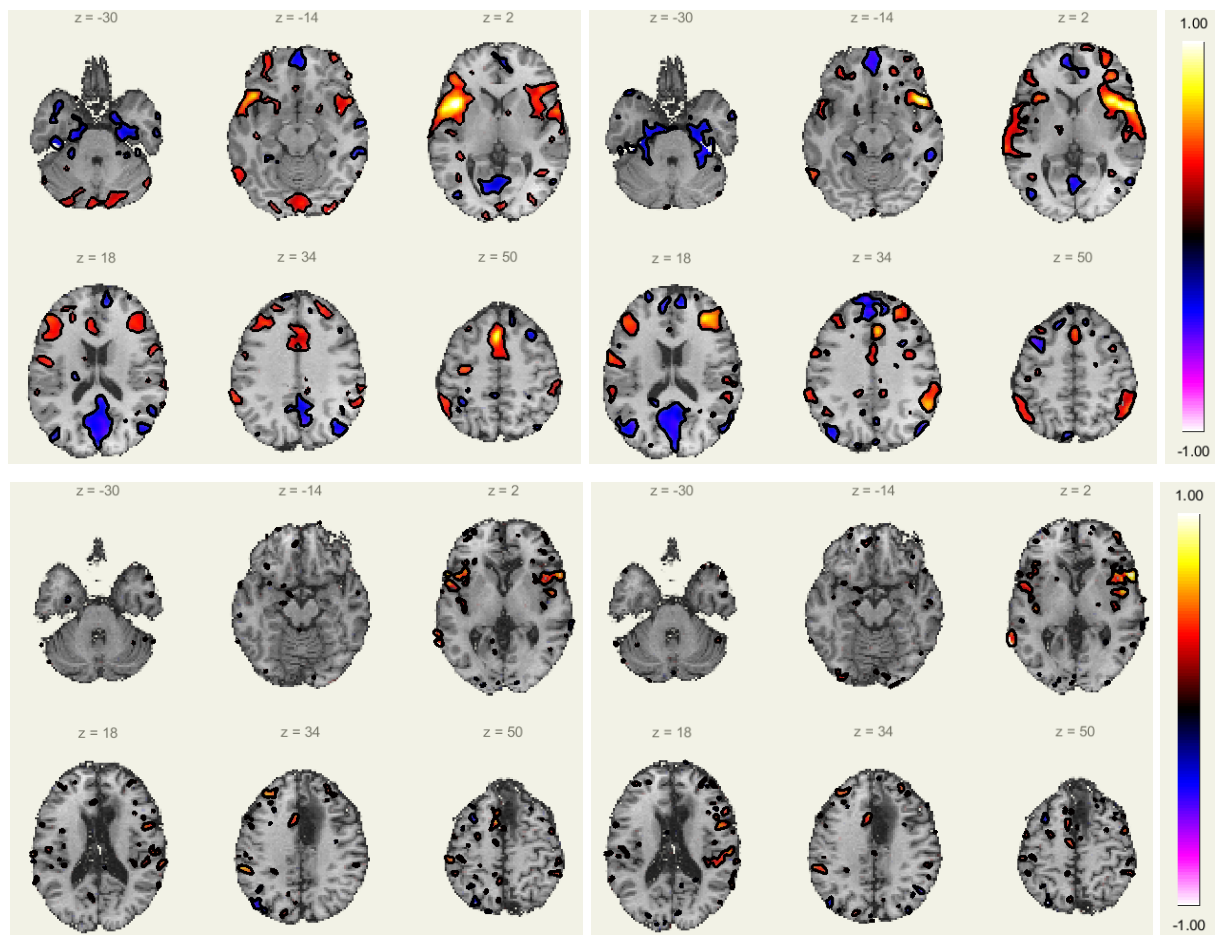


Figura 62: Saliency Network anterior insula (SN.AI) left (a sinistra) and right (a destra) sano (sopra) split brain (sotto).

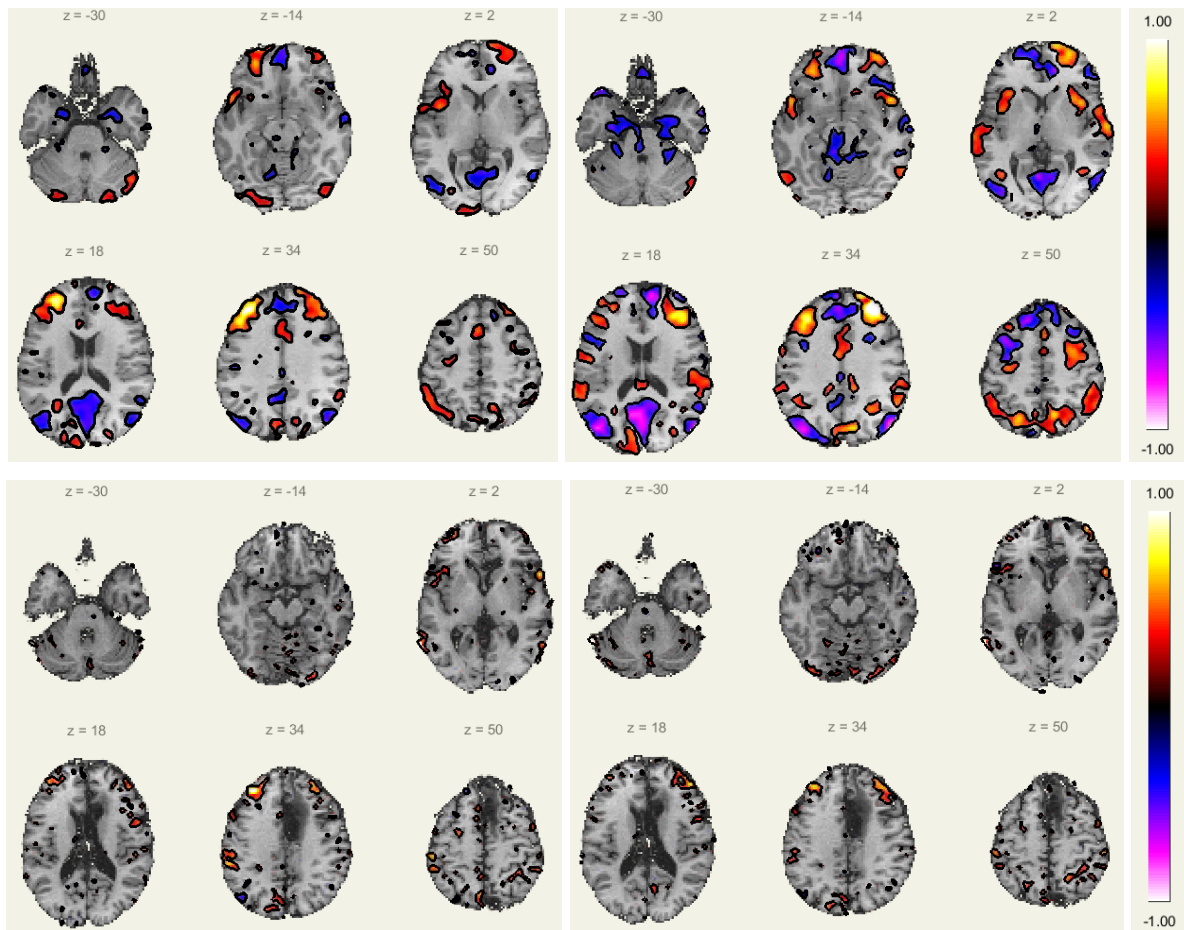


Figura 63: Salience Network rostral prefrontal cortex (SN.RPFC) left (a sinistra) and right (a destra) sano (sopra) split brain (sotto).

Il secondo metodo applicato corrisponde alla creazione della matrice di connettività ROI-to-ROI (RRC) che caratterizza le 8 RSNs forniti dal toolbox come reti di interesse, includendo le 32 ROIs.

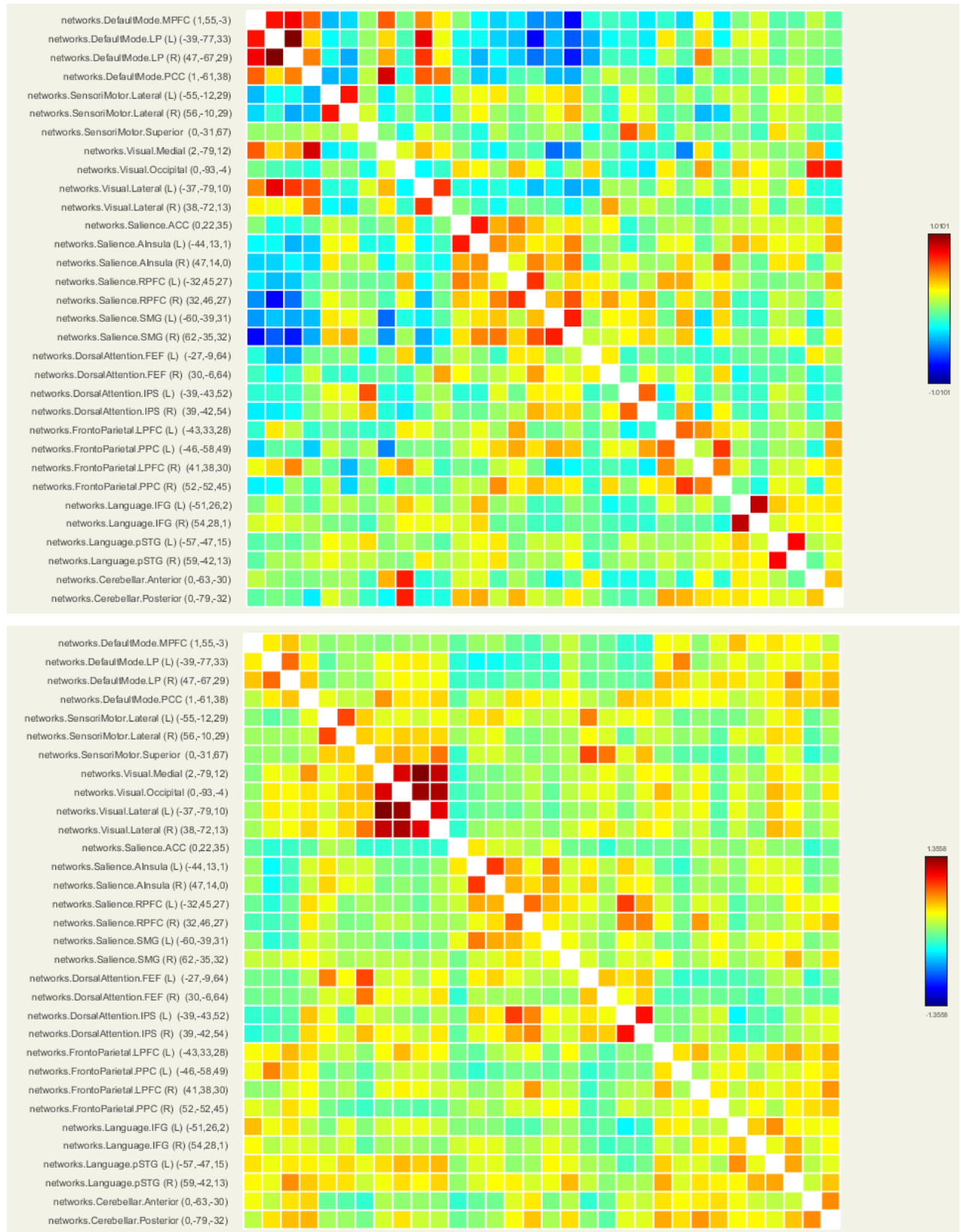


Figura 64: matrici RRC soggetto sano (sopra) soggetto split brain (sotto).

Discussione

L'obiettivo di questa tesi è stato investigare la connettività funzionale e le attivazioni bilaterali nel cervello di un paziente sottoposto a resezione chirurgica del CC, e di un soggetto sano. I risultati si basano sull'analisi dei dati fMRI a riposo utilizzando i metodi seed-based connectivity e ROI-to-ROI connectivity, messi a disposizione dal toolbox CONN, creato da Susan Whitfield-Gabrieli e Alfonso Nieto Castañón, basato su SPM, per l'analisi della connettività funzionale nello stato di riposo e durante le attività. I pazienti sottoposti a intervento di callosotomia per alleviare l'epilessia grave intrattabile farmacologicamente offrono un'opportunità unica per la ricerca nel valutare i meccanismi delle interazioni interemisferiche e della neuroplasticità (Uddin et al., 2008). L'analisi è stata condotta su un soggetto sano e un paziente epilettico sottoposto a callosotomia totale circa 19 anni prima dell'acquisizione. Mentre alcuni studi sulla coordinazione interemisferica in partecipanti sani suggeriscono connessioni esclusivamente cortico-corticali, altri coinvolgono contributi subcorticali [83]. Pertanto, si potrebbe considerare il fatto che il cervello, durante la sua maturazione nel corso degli anni, abbia sviluppato nuove vie di comunicazione subcorticali, alternative al CC, che sono state riorganizzate in seguito all'intervento di callosotomia. Attraverso queste vie alternative, l'emisfero destro sarebbe in grado di comunicare con quello sinistro, e viceversa, mantenendo così una possibile comunicazione interemisferica anche in seguito alla callosotomia. I risultati dell'analisi del paziente split brain mostrano un modesto grado di bilateralità nella maggior parte delle RSNs. Per questo motivo, la connettività funzionale delle reti risulta alterata. Tuttavia, dalle matrici di correlazione ROI-to-ROI, si osserva un alto grado di bilateralità nelle aree visive e un grado più limitato nelle aree della Default Mode Network, della Sensorimotor Network, della Salience Network e della Dorsal Attention Network. Come mostrato nello studio di Uddin e colleghi [83], è generalmente accettato che esista un certo grado di trasferimento interemisferico nei pazienti split-brain, poiché è possibile che alcune RSNs specifiche mantengano una presenza bilaterale dopo la callosotomia totale, suggerendo che la loro coordinazione sia di origine subcorticale dopo l'intervento chirurgico. Di conseguenza, il confronto con i cervelli integri suggerisce che nel cervello dei soggetti sani esista un possibile meccanismo duale, il che significa che meccanismi corticali e subcorticali lavorano insieme per coordinare le reti. La persistenza di alcune reti bilaterali nei pazienti dimostra che il CC non è l'unico percorso coinvolto nelle connessioni tra i due emisferi. Per quanto riguarda le funzioni eccitatorie e inibitorie del CC, sia dall'analisi seed-based che dalle matrici di correlazione, è possibile osservare che la callosotomia interrompe non solo la connettività funzionale positiva ma anche quella negativa in molte ROIs [84], un dato coerente con l'idea che il CC supporti sia l'eccitazione che l'inibizione.

Una limitazione significativa di questa tesi è rappresentata dal ridotto numero di soggetti analizzati, il quale potrebbe compromettere la generalizzabilità e la validità dei risultati ottenuti. La presenza di un campione così limitato rende difficile trarre conclusioni robuste e affidabili, in quanto l'incertezza e la variabilità potrebbero influire sull'accuratezza delle misurazioni. Un ulteriore limite riguarda l'utilizzo delle 8 reti predefinite in CONN, ottenute dai risultati di parcellizzazione del set di dati del progetto Human Connectome (HCP) (497 soggetti) utilizzando l'analisi dei componenti indipendenti (ICA), le quali non coincidono né con le 10 reti di Smith, né con le 8 reti di Beckmann. Questa discrepanza tra le RSNs utilizzate in questo lavoro e quelle comunemente riconosciute nella letteratura scientifica potrebbe influire sull'interpretazione e sulla comparabilità dei risultati.

Conclusioni

Nel complesso, questo studio ha rilevato una connettività interemisferica funzionale anche dopo la resezione del corpo calloso ed ha confermato che quest'ultimo è una struttura fondamentale nel cervello ed è coinvolto nell'integrazione delle informazioni tra emisferi. La presenza di attivazioni bilaterali nel paziente split brain suggerisce la presenza di connessioni subcorticali alternative che permettono comunque la comunicazione tra i due emisferi cerebrali. Queste vie subcorticali sembrano essere sufficienti per trasmettere informazioni visive di base, come evidenziato dall'attivazione bilaterale delle ROIs appartenenti alla rete visiva nel paziente analizzato. Inoltre, le aree sensorimotorie, mostrano una certa bilateralità, suggerendo di nuovo la presenza di vie alternative al corpo calloso.

In futuro, sarebbe altamente interessante condurre studi che includano acquisizioni periodiche di soggetti split brain al fine di valutare l'adattamento del cervello nel tempo. Questi studi potrebbero esaminare il cervello dei soggetti prima dell'intervento, immediatamente dopo l'intervento e successivamente a intervalli regolari. L'analisi longitudinale consentirebbe di ottenere una visione più approfondita dell'adattamento a lungo termine del cervello dopo la callosotomia. Ciò potrebbe rivelare cambiamenti dinamici nelle funzioni cognitive, nella plasticità cerebrale e nei meccanismi di compensazione. In definitiva, ulteriori studi che adottano un approccio longitudinale e includono un ampio numero di soggetti consentirebbero di approfondire la nostra comprensione dell'effetto della callosotomia sul cervello e potrebbero aprire nuove strade per la riabilitazione e l'assistenza a lungo termine dei pazienti sottoposti a tale intervento chirurgico.

Bibliografia

- [1] Treccani, Dizionario di medicina. Cervello. 2010
https://www.treccani.it/enciclopedia/cervello_%28Dizionario-di-Medicina%29/.
- [2] G. Anastasi et al. Anatomia umana vol 3. Edi Ermes. 2019.
- [3] Matthew N. Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Principi di fisiologia di Berne e Levy. Edra.2007. Quarta Edizione.
- [4] E. Lupia Palmieri, M. Parotto, S. Saraceni, G. Strumia. Scienze integrate volume CD. Zanichelli. 2010.
- [5] Giuseppe C. Balboni, et al. Anatomia Umana, Vol. 3. Edi. Ermes. 1976.
- [6] Song J, Yang X, Zhou Y, Chen L, Zhang X, Liu Z, Niu W, Zhan N, Fan X, Khan AA, Kuang Y, Song L, He G, Li W. Dysregulation of neuron differentiation in an autistic savant with exceptional memory. Mol Brain. 2019 Nov 07;12(1):91.
- [7] Jawabri KH, Sharma S. Physiology, Cerebral Cortex Functions. 2022 Apr 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
- [8] Mercadante AA, Tadi P. Neuroanatomy, Gray Matter. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
- [9] Guyton e Hall. Fisiologia Medica. EDRA. 2016. Tredicesima edizione.
- [10] Strotzer, M. One Century of Brain Mapping Using Brodmann Areas*. Clin Neuroradiol 19, 179–186 (2009).
- [11] Zaidel DW. Split-brain, the right hemisphere, and art: fact and fiction. Prog Brain Res. 2013; 204:3-17.
- [12] AA.VV. Fisiologia medica Vol.1. Edi Ermes. 2010. Terza edizione.
- [13] Treccani. Enciclopedia della Scienza e della Tecnica. Neuroimaging. 2008
https://www.treccani.it/enciclopedia/neuroimaging_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/.
- [14] Gonzalez and Woods, Digital Image Processing, Prentice Hall, 2008, 978-0- 131-68728-8 (pp. 71-74).

- [15] F. Bloch, “A Quantitative Determination of the Neutron Moment in Absolute Nuclear Magnetons”, *Phys. Rev.*, 1940, 57, 111.
- [16] E. M. Purcell, H. C. Torrey e R. V. Pound, “Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid”, *Phys. Rev.* 1946, 69, 37.
- [17] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Nuclear magnetic resonance". *Encyclopedia Britannica*, 20 Mar. 2023, <https://www.britannica.com/science/nuclear-magnetic-resonance>.
- [18] Buxton RB. *Introduction to Functional Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques*. (2009) Cambridge University Press.
- [19] Stig E. Forshult. *Magnetic Resonance Imaging – MRI – An Overview*. Karlstad University Studies, 2007.
- [20] Glover GH. Overview of functional magnetic resonance imaging. *Neurosurg Clin N Am*. 2011 Apr;22(2):133-9, vii.
- [21] Ogawa S., 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24):9868–9872.
- [22] Buxton R., Wong E., Frank L., 1998. Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magnetic Resonance in Medicine*, 39(6):855–864.
- [23] Fox M.D., Raichle M.E. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9):700–711, 2007.
- [24] Dongyang Zhang and Marcus E Raichle. Disease and the brain’s dark energy. *Nature Reviews Neurology*, 6(1):15–28, 2010.
- [25] S Dimou, RA Battisti, DF Hermens, and J Lagopoulos. A systematic review of functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging modalities used in presurgical planning of brain tumour resection. *Neurosurgical review*, 36(2):205–214, 2013.
- [26] K. R. Van Dijk, T. Hedden, A. Venkataraman, K. C. Evans, S. W. Lazar, and R. L. Buckner. Intrinsic Functional Connectivity as a Tool for Human Connectomics: Theory, Properties, and Optimization. *Journal of Neurophysiology*, 103:297 – 321, 2010.

- [27] Karl J Friston, Andrew P Holmes, Keith J Worsley, J-P Poline, Chris D Frith, and Richard SJ Frackowiak. Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach. *Human brain mapping*, 2(4):189–210, 1994.
- [28] Martijn P Van Den Heuvel and Hilleke E Hulshoff Pol. Exploring the brain network: a review on resting-state fmri functional connectivity. *European Neuropsychopharmacology*, 20(8):519–534, 2010.
- [29] Dietmar Cordes, Victor M Haughton, Konstantinos Arfanakis, John D Carew, Patrick A Turski, Chad H Moritz, Michelle A Quigley, and M Elizabeth Meyerand. Frequencies contributing to functional connectivity in the cerebral cortex in “resting state” data. *American Journal of Neuroradiology*, 22(7):1326–1333, 2001.
- [30] Friston, K.J., Functional and effective connectivity: a review. *Brain Connect*, 2011. 1(1): p. 13-36.
- [31] Iraj A, Calhoun VD, Wiseman NM, Davoodi-Bojd E, Avanaki MRN, Haacke EM, Kou Z. The connectivity domain: Analyzing resting state fMRI data using feature-based data-driven and model-based methods. *Neuroimage*. 2016 Jul 1; 134:494-507.
- [32] C. F. Beckmann and S. M. Smith, "Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging," in *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 23, no. 2, pp. 137-152, Feb. 2004.
- [33] K. Worsley, K. Friston. Analysis of fMRI data time series revisited-again. *Neuroimage*, 2: 173-181, 1995.
- [34] P. Comon. Independent component analysis - A new concept? *Signal Processing*, 36: 287-314, 1994.
- [35] C. Jutten, J. Herault. Blind separation of sources - Part I: An adaptive algorithm based on neuromimetic architecture. *Signal Processing*, 24: 1-10, 1991.
- [36] M.J. McKeown, S. Makeig, G.G. Brown, T.P. Jung, S.S. Kindermann, A.J. Bell, T.J. Sejnowsky. Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components. *Human Brain Mapping*, 6(3): 160-188, 1998.
- [37] Beer, A.L., Plank, T. & Greenlee, M.W. Diffusion tensor imaging shows white matter tracts between human auditory and visual cortex. *Exp Brain Res* 213, 299–308 (2011).

- [38] Jun Zhang, Hao Ji, Ning Kang, and Ning Cao. Fiber tractography in diffusion tensor magnetic resonance imaging: A survey and beyond. In *Proceedings of the 2005 International Symposium on Medical Imaging and Computing*, pages 39–56, 2005.
- [39] Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 May 29;360(1457):1001-13.
- [40] Smith SM, Fox PT, Miller KL, Glahn DC, Fox PM, Mackay CE, Filippini N, Watkins KE, Toro R, Laird AR, Beckmann CF. Correspondence of the brain's functional architecture during activation and rest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):13040-5.
- [41] Gusnard, D.A. and M.E. Raichle, Searching for a baseline: Functional imaging and the resting human brain. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(10): p. 685-694.
- [42] Greicius, M.D., et al., Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100(1): p. 253-258.
- [43] Stam, C.J. and J.C. Reijneveld, Graph theoretical analysis of complex networks in the brain. *Nonlinear Biomedical Physics*, 2007. 1: p. 3-3.
- [44] Rubinov, M. and O. Sporns, Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*, 2010. 52(3): p. 1059-69.
- [45] Bullmore, E. and O. Sporns, Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci*, 2009. 10(3): p. 186-98.
- [46] Gleiser, P.M. and V.I. Spoormaker, Modelling hierarchical structure in functional brain networks. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2010. 368(1933): p. 5633-44.
- [47] Butts, C.T., Revisiting the foundations of network analysis. *Science*, 2009. 325(5939): p. 414-6.
- [48] Gleiser, P.M. and V.I. Spoormaker, Modelling hierarchical structure in functional brain networks. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2010. 368(1933): p. 5633-44.
- [49] Hyvarinen A., Oja E., 2000. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Networks*, 13(4-5):411-430.
- [50] Whitfield-Gabrieli, S., & Nieto-Castanon, A. (2012). Conn: A functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks. *Brain connectivity*, 2(3), 125-141.

- [51] Andersson JLR, Hutton C, Ashburner J, Turner R, Friston K (2001). Modelling geometric deformations in EPI time series. *NeuroImage* 13:90-919.
- [52] Henson, R. N. A., Buechel, C., Josephs, O., & Friston, K. J. (1999). The slice-timing problem in event-related fMRI. *NeuroImage*, 9, 125.
- [53] Ashburner, J. and Friston, K J. (2005). Unified segmentation. *NeuroImage*, 26:839–851.
- [54] Behzadi, Y., Restom, K., Liao, J., & Liu, T. T. (2007). A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. *Neuroimage*, 37(1), 90-101.
- [55] Friston, K. J., Williams, S., Howard, R., Frackowiak, R. S., & Turner, R. (1996). Movement-related effects in fMRI time-series. *Magnetic resonance in medicine*, 35(3), 346-355.
- [56] Whitfield-Gabrieli, S., & Nieto-Castanon, A. (2012). Conn: a functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks. *Brain connectivity*, 2(3), 125-141.
- [57] Chai, X. J., Castañón, A. N., Öngür, D., & Whitfield-Gabrieli, S. (2012). Anticorrelations in resting state networks without global signal regression. *Neuroimage*, 59(2), 1420-1428.
- [58] Hallquist, M. N., Hwang, K., & Luna, B. (2013). The nuisance of nuisance regression: spectral misspecification in a common approach to resting-state fMRI preprocessing reintroduces noise and obscures functional connectivity. *Neuroimage*, 82, 208-225.
- [59] Hart M.G, Price S.J, Suckling J., 2017. Functional connectivity networks for preoperative brain mapping in neurosurgery. *J Neurosur.* 126(6):1941–1950.
- [60] Latora, V., Marchiori, M. (2001). Efficient behavior of small-world networks. *Physical Review Letters* 87: 198701-4.
- [61] Achard, S., Bullmore, E. (2007). Efficiency and cost of economical brain functional networks. *PLoS Comput. Biol.* 3, e17.
- [62] Nieto-Castanon, A. (2020). FMRI minimal preprocessing pipeline. In *Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN* (pp. 3–16). Hilbert Press.
- [63] Andersson, J. L., Hutton, C., Ashburner, J., Turner, R., & Friston, K. J. (2001). Modeling geometric deformations in EPI time series. *Neuroimage*, 13(5), 903-919.
- [64] Friston, K. J., Ashburner, J., Frith, C. D., Poline, J. B., Heather, J. D., & Frackowiak, R. S. (1995). Spatial registration and normalization of images. *Human brain mapping*, 3(3), 165-189.

- [65] Henson, R. N. A., Buechel, C., Josephs, O., & Friston, K. J. (1999). The slice-timing problem in event-related fMRI. *NeuroImage*, 9, 125.
- [66] Sladky, R., Friston, K. J., Tröstl, J., Cunnington, R., Moser, E., & Windischberger, C. (2011). Slice-timing effects and their correction in functional MRI. *Neuroimage*, 58(2), 588-594.
- [67] Whitfield-Gabrieli, S., Nieto-Castanon, A., & Ghosh, S. (2011). Artifact detection tools (ART). Cambridge, MA. Release Version, 7(19), 11.
- [68] Power, J. D., Mitra, A., Laumann, T. O., Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., & Petersen, S. E. (2014). Methods to detect, characterize, and remove motion artifact in resting state fMRI. *Neuroimage*, 84, 320-341.
- [69] Nieto-Castanon, A. (submitted). Preparing fMRI Data for Statistical Analysis. In M. Filippi (Ed.). *fMRI techniques and protocols*. Springer.
- [70] Calhoun, V.D., Wager, T.D., Krishnan, A., Rosch, K.S., Seymour, K.E., Nebel, M.B., Mostofsky, S.H., Nyalakanai, P. and Kiehl, K. (2017). The impact of T1 versus EPI spatial normalization templates for fMRI data analyses (Vol. 38, No. 11, pp. 5331-5342).
- [71] Ashburner, J., & Friston, K. J. (2005). Unified segmentation. *Neuroimage*, 26(3), 839-851.
- [72] Ashburner, J. (2007). A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*, 38(1), 95-113.
- [73] Nieto-Castanon, A. (2020). FMRI denoising pipeline. In *Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN* (pp. 17–25). Hilbert Press.
- [74] Friston, K. J., Williams, S., Howard, R., Frackowiak, R. S., & Turner, R. (1996). Movement-related effects in fMRI time-series. *Magnetic resonance in medicine*, 35(3), 346-355.
- [75] Hallquist, M. N., Hwang, K., & Luna, B. (2013). The nuisance of nuisance regression: spectral misspecification in a common approach to resting-state fMRI preprocessing reintroduces noise and obscures functional connectivity. *Neuroimage*, 82, 208-225.
- [76] Behzadi, Y., Restom, K., Liau, J., & Liu, T. T. (2007). A component-based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. *Neuroimage*, 37(1), 90-101.
- [77] Chai, X. J., Nieto-Castanon, A., Ongur, D., & Whitfield-Gabrieli, S. (2012). Anticorrelations in resting state networks without global signal regression. *Neuroimage*, 59(2), 1420-1428.

- [78] Nieto-Castanon, A. (2020). General Linear Model. In Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN (pp. 63–82). Hilbert Press.
- [79] Worsley, K. J., Marrett, S., Neelin, P., Vandal, A. C., Friston, K. J., & Evans, A. C. (1996). A unified statistical approach for determining significant signals in images of cerebral activation. *Human brain mapping*, 4(1), 58-73.
- [80] Nieto-Castanon, A. (2020). Cluster-level inferences. In Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN (pp. 83–104). Hilbert Press.
- [81] Rong B, Huang H, Gao G, Sun L, Zhou Y, Xiao L, Wang H, Wang G. Widespread Intra- and Inter-Network Dysconnectivity among Large-Scale Resting State Networks in Schizophrenia. *J Clin Med*. 2023 Apr 28;12(9):3176.
- [82] http://www.nitrc.org/projects/nyu_trt.
- [83] Uddin L.Q., Mooshagian E., Zaidel E., et al., “Residual functional connectivity in the splitbrain revealed with resting-state functional MRI”, Chapter:19(7) Pages:703-9, 2008, Neuroreport.
- [84] Johnston, J.M., Vaishnavi, S.N., Smyth, M.D., Zhang, D., He, B.J., Zempel, J.M., Shimony, J.S., Snyder, A.Z., Raichle, M.E., 2008. Loss of Resting Interhemispheric Functional Connectivity after Complete Section of the Corpus Callosum. *J. Neurosci*. 28, 6453–6458.

Ringraziamenti

Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e comprensione, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato, e a chi mi ha accompagnato durante questi tre anni.

Un ringraziamento speciale è dedicato alla mia relatrice, la Prof.ssa Laura Burattini, la cui passione e capacità di coinvolgere gli studenti hanno avuto un impatto significativo su di me e sulla scelta dell'argomento trattato.

Un ringraziamento particolare va alla mia correlatrice, la Dott.ssa Ilaria Marcantoni, che mi ha seguito con pazienza e disponibilità, suggerendomi puntualmente le giuste modifiche da apportare alla mia tesi, e mi ha insegnato ad affrontare le sfide con curiosità. Sono grata per il tempo che mi ha dedicato, senza mai lasciarmi indietro.

Ringrazio, inoltre, la mia correlatrice la Prof.ssa Mara Fabri, che grazie alle sue profonde conoscenze ha fornito un prezioso contributo nell'interpretazione dei risultati.

Desidero esprimere la mia gratitudine per chi ha avuto un ruolo fondamentale nella mia tesi. Queste persone sono il Prof. Gabriele Polonara, direttore di Neuroradiologia, le Dott.sse Mojgan Ghoushi e Nathalie Herbert, dirigenti medici di Neuroradiologia, Luigi Imperiale, Lucio Montesi, Simone Marinelli e Alessio Canari, Tecnici di Neuroradiologia (acquisizione e salvataggio dati), Marco Valenti, Luca Reversi e Francesco Mariotti, fisici del Servizio di Neuroradiologia, la Dott.ssa Nicoletta Foschi, dirigente medico di Neurologia, e la Prof.ssa Simona Lattanzi, della Clinica Neurologica, referenti per i pazienti epilettici, e per ultima, ma non per importanza, Giusi Piccolantonio, per il lavoro pionieristico.

Per finire vorrei ringraziare tutti i miei familiari vicini e lontani, il mio fidanzato, le amiche e gli amici di sempre, e tutte le persone che hanno incrociato il mio cammino durante questi anni.