

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Tecnologie Biomediche

XXVIII ciclo



**STUDIO DELLO SVILUPPO CEREBRALE IN ETÀ PEDIATRICA
MEDIANTE TECNICHE AVANZATE DI ELABORAZIONE DI
IMMAGINI A RISONANZA MAGNETICA**

Coordinatore del corso di dottorato: Prof.ssa Marina Del Puppo

Tutor: Prof.ssa Rosa Maria Moresco

Co-tutor: Dott.ssa Paola Scifo

Tesi di Dottorato di:

Elisa Marchetta

Matr. 774902

Anno Accademico 2015 / 2016

Sommario

Nel corso della vita di un individuo lo sviluppo dell'encefalo procede dall'età fetale a quella adulta introducendo cambiamenti sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Di particolare interesse è lo studio dello sviluppo cerebrale in età pediatrica dove, a partire dalla nascita, si assiste ad una sostanziale modifica di strutture e tessuti e, parallelamente, alla definizione di tutte le funzioni cognitive. L'imaging a risonanza magnetica (RM) permette di seguire questo processo acquisendo, in modo non invasivo, immagini dell'encefalo ad alta risoluzione e a diverse pesature di immagine (T1, T2, DTI,...).

Questo progetto di dottorato ha riguardato lo sviluppo e l'applicazione di metodi avanzati di analisi dell'immagine che permettono di studiare in maniera qualitativa e quantitativa le modificazioni che intercorrono nel processo maturativo dell'encefalo dalla nascita all'età adulta sia dal punto di vista strutturale che del punto di vista della connettività cerebrale.

La prima parte del progetto è stata focalizzata sullo sviluppo di un metodo per la creazione di atlanti, detti template, con l'obiettivo di generare delle immagini RM anatomiche di riferimento che descrivono le tappe del normale sviluppo dell'encefalo in età pediatrica, 0-17 anni, suddividendo tale periodo in sei range di età. L'utilizzo di template specifici è molto importante sia in ambito diagnostico per avere un riferimento di normalità, sia in ambito di ricerca nel contesto di studi di gruppo. In particolare, il mio lavoro ha riguardato l'implementazione di un metodo di normalizzazione e registrazione adattativo basato su Free-Form Deformation. La caratteristica principale di tale metodo che lo rende di grande interesse in questo ambito è la sua versatilità. Rispetto ad altri algoritmi presenti in letteratura, esso risulta utilizzabile con diverse pesature RM e a diversi range d'età adattando e ottimizzando di volta in volta suoi parametri dipendenti dalle caratteristiche delle immagini e da caratteristiche della popolazione, quali numerosità dei soggetti e distanza dall'età media.

Il metodo si è dimostrato consistente e il suo utilizzo in futuro potrà estendersi anche in altri ambiti quali per esempio le valutazioni longitudinali in malattie progressive.

La seconda parte del progetto di tesi ha riguardato lo studio di immagini di RM funzionale di Resting-State. Lo studio è stato effettuato su una popolazione di neonati prematuri, in modo da analizzare la connettività funzionale e i suoi cambiamenti proprio nelle primissime fasi di sviluppo dell'encefalo, focalizzando l'attenzione su reti di connettività di base (ex. motoria, visiva) e reti complesse (ex. cognitive). Il metodo implementato introduce la possibilità di effettuare analisi di correlazione a più livelli di risoluzione. Il primo livello riguarda lo studio delle singole reti, attraverso Seed Correlation Analysis, sia sul singolo soggetto che nell'intero gruppo analizzato. Il secondo livello consiste nello studio dell'interconnessione tra le diverse reti, mediante analisi di correlazione e regressione sui segnali estratti da diverse aree cerebrali appartenenti alle reti stesse. Questa metodologia può essere impiegata anche in altri ambiti, per fornire, per esempio un maggiore supporto in fase di diagnosi di una specifica patologia.

Data la complessità dei processi di maturazione cerebrale, soprattutto in età pediatrica, è di grande importanza lo sviluppo di metodi di analisi sempre più efficienti e sofisticati. Questo progetto si è inserito in questo ambito attraverso lo sviluppo di tecniche che permettono l'integrazione dei diversi tipi di dati in grado di descrivere al meglio i molteplici aspetti (anatomia, funzionalità) coinvolti nello sviluppo encefalico.

Abstract

Brain development is a continuous process which, from fetal period to adulthood, introduces changes in the brain both from a structural and functional point of view. The cerebral development in pediatric subjects is an issue of particular interest since substantial modifications in structures and tissues is observed together with the definition of cognitive functions. Magnetic resonance imaging enables to follow this process, by acquiring, in a non invasive way, high resolution images of the brain with several image contrasts (T1, T2, DTI, ...).

This PhD project has been focused on the implementation and application of advanced image processing methods that can be employed to qualitatively and quantitatively study the changes induced by maturation on brain structures and cerebral connectivity.

The first part of the project has been dedicated to the implementation of a method to create brain atlases. The whole pediatric interval (0-17 years old) has been divided in six age ranges to describe the fundamental steps of normal brain development in children. Six brain atlases corresponding to these stages have been created. The availability of specific templates is very important to be used both as a normal reference in diagnostics and for group studies in research. In particular, an adaptive registration method based on Free-form Deformation was implemented. Compared to other approaches already published in literature, this method is characterized by a strong flexibility. In fact, it can be used with different image contrasts and at different age ranges by optimizing registration parameters depending on the image and population characteristics, such as the number of samples and their distance from the mean age of the range. The method has been demonstrated to be consistent, suggesting applications also for different purposes, for example it could be useful for longitudinal evaluation of progressive pathologies.

The second part of the project concerned the study of functional magnetic resonance images in Resting State. The study was performed on preterm newborns subjects, in order to analyze the changes in functional connectivity during the very early brain developmental stages. The attention was focused on basic (ex. motor, visual) and high level (ex. cognitive, language) connectivity networks. The implemented method introduces the ability of performing correlation analysis at different resolution levels.

The first resolution level is characterized by the study of each network, through image based Seed Correlation Analysis, both at single subject and at group level. The second resolution level consists in the study of the inter-network connections, performing correlation and regression analyses on BOLD signals extracted from brain areas belonging to the networks. This methodology might be employed also for other purposes, for example to provide a support during the diagnostic process of a pathology.

Given the complexity of cerebral maturation process, in particular during pediatric period, the implementation of efficient and sophisticated methods for image processing is extremely important. This project fits in this context with the development of techniques for the integration of multiple types of data, which describe different aspects (anatomy, functionality) involved in brain development.

Indice

Introduzione	p. 9
Capitolo 1. Gli atlanti di normalità	p. 14
1.1 Il progetto Colibrì	p. 14
1.1.1 Introduzione.	p. 14
1.1.2 Inclusione dei soggetti nei database	p. 17
1.1.3 Criticità	p. 19
1.1.4 Il ruolo del progetto di dottorato in Colibrì	p. 20
1.2 Il protocollo di acquisizione	p. 20
1.2.1 Lo sviluppo cerebrale	p. 22
1.2.2 Le fasce di età	p. 25
1.2.3 L'imaging RM nello sviluppo cerebrale	p. 37
1.2.4 Definizione di protocolli per l'acquisizione di casi normali	p. 34
1.3 Stato dell'arte sugli atlanti di normalità	p. 39
1.4 Il metodo implementato	p. 46
1.4.1 Pre-processing delle immagini	p. 47
1.4.2 La registrazione.	p. 51
1.4.3 Le trasformazioni medie e i pesi	p. 59
1.4.4 Creazione degli atlanti	p. 61
1.5 Risultati	p. 63
1.6 Discussione	p. 83
Capitolo 2. La risonanza magnetica funzionale in Resting State (RS-fMRI).	p. 91
2.1.1 Introduzione alla risonanza funzionale in Resting State	p. 91
2.1.2 La RS-fMRI negli studi pediatrici	p. 97
2.2 Studio delle reti cerebrali in neonati prematuri tramite RS-fMRI	p. 104
2.2.1 Materiali e metodi	p. 104
2.2.2 Risultati e discussione	p. 110
2.3 Studio dello sviluppo delle connessioni funzionali del DMN con aree neurocognitive nei neonati pretermine mediante RS-fMRI	p. 120
2.3.1 Materiali e metodi	p. 120
2.3.2 Risultati	p. 134
i. SCA di gruppo	

- ii. *Correlazione dei segnali BOLD*
- iii. *Correlazione con Z-score*
- iv. *Regressioni con i parametri di interesse*

2.3.3	<i>Discussione</i>	p. 148
Conclusioni		p. 150
Bibliografia		p. 156

Introduzione

All'interno del corpo umano, l'encefalo rappresenta l'organo più complesso, che gestisce tutto ciò che siamo in grado di percepire e fare. Tuttavia, ad oggi, nei suoi riguardi disponiamo di una conoscenza non ancora completa.

L'encefalo, insieme al midollo spinale, compone il sistema nervoso centrale, che permette lo scambio dei segnali all'interno dell'organismo. In questo sistema, il cervello svolge un ruolo di fondamentale importanza, perché diventa il fulcro del suo funzionamento, in quanto è sia il centro in cui gli stimoli provenienti dall'esterno vengono ricevuti ed elaborati sia quello da cui siamo in grado di far ripartire altrettanti stimoli diretti ai differenti sistemi dell'organismo. L'encefalo è il centro afferente di tutte le vie sensoriali: uditiva, visiva, olfattiva, tattile, propriocettiva, termica e dolorifica. I segnali che arrivano al cervello da queste vie vengono quindi elaborati, memorizzati ed utilizzati. Allo stesso tempo, il cervello è anche il centro implicato nei processi motori, è infatti qui che avviene la programmazione del movimento, in cui vengono elaborate le informazioni percettive e viene comandata e gestita l'esecuzione del gesto motorio. Le funzioni per cui però il cervello umano si differenzia maggiormente da quello degli altri mammiferi sono quelle mentali, relative prevalentemente alla memoria, all'associazione, alla cognizione e al linguaggio. Questi processi di alto livello, sono molto complessi e necessitano dello sviluppo di funzionalità specifiche e di una grande capacità di interazione ed elaborazione dei segnali.

Tutti questi processi sono possibili grazie alla trasmissione dei segnali che, sotto forma di impulsi elettrici, vengono scambiati tra le zone cerebrali preposte all'esecuzione di specifiche funzioni. Il cervello può quindi essere descritto con un modello simile ad una rete in cui le aree cerebrali della materia grigia costituiscono i nodi ed i fasci di materia bianca costituiscono le connessioni che permettono la trasmissione dei segnali tra esse. Il midollo spinale permette invece la trasmissione dei segnali dai sistemi più periferici al cervello e dal cervello agli altri sistemi.

Data la centralità del ruolo dell'encefalo nel normale funzionamento dell'organismo, ne consegue, che anomalie cerebrali per cause patologiche generino significativi effetti sull'intero sistema. Non a caso, la maggior parte delle patologie che affliggono

l'encefalo hanno effetti sul corretto svolgimento di molti di questi processi, tra cui in particolare quelli motori, visivi e linguistici.

Lo studio delle caratteristiche anatomiche e funzionali dell'encefalo è di grande interesse, perché la conoscenza dell'anatomia e delle funzionalità associate a ciascuna regione cerebrale, permette di comprendere i meccanismi di generazione di tutti i processi cerebrali basilari e complessi.

Queste conoscenze permettono, in ambito patologico, di caratterizzare una malattia tramite il riscontro di anomalie e di comprendere e predire gli esiti funzionali dovuti alla patologia. La possibilità di riuscire a specificare la corrispondenza tra sintomi e cause, può essere utilizzata in ambito medico, oltre che per approfondire le conoscenze rispetto alle patologie, anche per migliorare le tecniche di trattamento e il loro effetto. Inoltre, in ambito tecnologico e bioingegneristico, la conoscenza della localizzazione funzionale può permettere la creazione di dispositivi ausiliari per persone affette da gravi malattie, che producono un miglioramento notevole nella vita dell'individuo. Si pensi ad esempio alle protesi acustiche e visive corticali che in caso di patologie riguardanti i rispettivi sistemi sensoriali, permettono al paziente di ricevere gli stimoli nelle aree preposte alle funzioni e quindi ottenere una risposta cerebrale.

Tutto ciò è però possibile solo se prima si possiede una conoscenza molto approfondita dell'anatomia e del funzionamento cerebrale in una popolazione normale, che può essere utilizzata come riferimento sia in ambito diagnostico sia nel contesto di studi di gruppo. La definizione di normalità è di per sé un concetto relativo, che si basa sullo studio dei soggetti che sono caratterizzati da una buona condizione di salute e che non presentano disturbi relativi ai diversi processi funzionali (motori, cognitivi, linguistici). Un gruppo di soggetti con queste caratteristiche sarà distribuito secondo una curva di normalità in cui verranno individuate le caratteristiche medie e l'intervallo di variabilità fisiologica dei soggetti normali, dovuto al fatto che i soggetti analizzati non sono identici tra loro. Nell'analisi e nella definizione del campione che definisce la normalità non ci si aspetta quindi che i dati di tutti i soggetti abbiano esattamente le stesse caratteristiche (anatomia, segnale, connettività), ma che, entro un certo limite, abbiano una variazione rispetto alle caratteristiche riscontrate più comunemente e che definiscono il riferimento.

Se queste conoscenze relative alla normalità risultano già molto importati nella popolazione adulta, l'interesse diventa ancora maggiore se si vanno a studiare le caratteristiche anatomico-funzionali dell'encefalo in età fetale, neonatale e pediatrica. Durante questo periodo di tempo, infatti, l'encefalo si forma e affronta un lungo periodo di sviluppo e maturazione, che termina verso la fine dell'adolescenza. Di particolare importanza sono il processo di formazione delle connessioni tra i neuroni e il processo di mielinizzazione, che aumenta l'efficacia della trasmissione degli impulsi neurali. Le principali modificazioni relative a questi due processi avvengono tra il secondo trimestre di gestazione e i primi tre anni di vita e sono strettamente collegati all'acquisizione della maggior parte delle funzionalità cerebrali. E' per questo che lo sviluppo di patologie a carico del sistema nervoso centrale durante questo periodo può causare ritardi e disturbi nella acquisizione delle tappe di sviluppo dei processi cognitivi, linguistici, comportamentali e motori.

L'imaging a Risonanza Magnetica (RM) risulta particolarmente efficace nello studio delle caratteristiche anatomiche e funzionali soprattutto nella popolazione pediatrica. Infatti, da una parte è una tecnica di imaging completamente non invasiva, quindi adatta ad essere utilizzata nei bambini, dall'altra permette, grazie alle diverse pesature (T1, T2, DTI, fMRI,...), di seguire i diversi aspetti del processo di sviluppo. Ogni pesatura, infatti è in grado di evidenziare una diversa caratteristica relativa ai tessuti cerebrali e di studiare le modificazioni che si susseguono durante la crescita.

Questo lavoro si inserisce nell'ambito dell'analisi di immagini RM durante lo sviluppo cerebrale e riguarda la creazione di metodi avanzati per l'analisi di immagini RM in popolazioni pediatriche. Tali metodi si propongono di estrapolare dalle immagini il maggior numero di informazioni e studiare in maniera qualitativa e quantitativa le modificazioni che intercorrono nel processo maturativo dell'encefalo dalla nascita all'età adulta, ricavando informazioni sia di tipo strutturale che relative alla connettività cerebrale.

In particolare, in questo lavoro di dottorato sono stati affrontati, dal punto di vista dell'elaborazione e dell'analisi delle immagini, due aspetti diversi ma complementari dello sviluppo cerebrale pediatrico.

Nella prima parte, più rivolta allo studio dell'anatomia dell'encefalo, è stato implementato un metodo di registrazione di immagini per la generazione degli atlanti di

normalità che descrivono lo sviluppo dell'encefalo in tutto il periodo pediatrico (0 - 17 anni). A questo scopo sono utilizzate sequenze anatomiche e strutturali di Risonanza Magnetica (T1, T2, DTI) per descrivere l'anatomia dell'encefalo e le modificazioni strutturali relative alle diverse fasi relative al processo di mielinizzazione. Le sequenze anatomiche sono infatti in grado di mostrare la mielinizzazione laddove si è già manifestata e di distinguere zone con diversi gradi di avanzamento di tale processo. La tecnica DTI, mediante lo studio della diffusione delle molecole di acqua dei tessuti, è utilizzata anche per localizzare le modificazioni micro-strutturali che anticipano la deposizione di mielina nelle fibre, a cui ci si riferisce con il termine di "pre-mielinizzazione".

Nella seconda parte del lavoro, più rivolta all'aspetto funzionale, è stato invece sviluppato un metodo che permette di analizzare l'attività cerebrale intrinseca in una popolazione di neonati pretermine e di analizzare le modificazioni che normalmente, nei soggetti a termine, avvengono prima della nascita. Questo tipo di studio è stato sviluppato mediante l'utilizzo di un'altra tecnica RM avanzata, la risonanza magnetica funzionale (fMRI) in Resting State, che misura la funzionalità di base del cervello in assenza di stimolazione esterna e permette, indirettamente, di valutare la connettività funzionale cerebrale.

Il lavoro di seguito presentato è così articolato:

Capitolo 1 - Creazione degli atlanti di normalità.

In questo capitolo viene presentato il progetto relativo alla creazione di atlanti di normalità, che ha avuto come obiettivo quello di generare delle immagini RM anatomiche di riferimento che descrivono le tappe del normale sviluppo dell'encefalo in età pediatrica, dagli 0 ai 17 anni.

Inizialmente vengono descritti il processo di reclutamento e le sequenze di acquisizione implementate per l'acquisizione ottimizzata nelle diverse fasce di età (sei range separati), e nelle tre pesature utilizzate: T1, T2 e DTI.

Successivamente viene illustrato il metodo vero e proprio che è stato sviluppato per la creazione degli atlanti. In particolare, viene descritto come è stato implementato il metodo di normalizzazione e registrazione adattativo basato su Free-Form Deformation. Vengono quindi presentate le specifiche del metodo con particolare attenzione sulla scelta di parametri dipendentemente dalle caratteristiche delle immagini e della popolazione. Infine vengono mostrati i risultati ottenuti con i relativi commenti.

Capitolo 2 - Analisi delle reti cerebrali tramite RS-fMRI

In questo secondo capitolo viene presentato il progetto relativo allo studio di immagini di RM funzionale di Resting-State effettuato su una popolazione di neonati prematuri. Dopo una introduzione sulla tecnica del Resting State e sul suo utilizzo in ricerca e in clinica, viene descritto il metodo utilizzato per adattare l'analisi della connettività funzionale alle primissime fasi di sviluppo dell'encefalo e per estrarne le informazioni più interessanti. Nei due studi presentati, l'attenzione viene focalizzata su diverse reti di connettività: da una parte quelle relative a funzioni di base, quali la rete motoria, visiva e uditiva, dall'altra viene analizzata la Default Mode Network (DMN), la rete considerata più complessa e legata a funzioni astratte e relative alla sfera personale (coscienza di sé, introspezione). Tale rete viene anche studiata in relazione ad altre due network di alto livello e legate a funzioni neurocognitive. In particolare il metodo implementato, attraverso il calcolo di correlazioni e regressioni permette di effettuare analisi di correlazione a più livelli di risoluzione: intra e inter network. Infine vengono presentati i risultati ottenuti, valutando la consistenza e le possibili applicazioni del metodo.

Capitolo 1.

Gli atlanti di normalità

1.1. Il progetto Colibrì

1.1.1 Introduzione

L'attività di dottorato svolta è stata parte di un progetto più esteso, il progetto Colibrì, finanziato dal Ministero Italiano della Salute per gli anni 2012-2016.

Colibrì (COLlection of pediatric Brain Images) ha come obiettivo la creazione di una infrastruttura italiana per la raccolta, la condivisione e l'elaborazione di immagini di Risonanza Magnetica (RM) dell'encefalo in soggetti in età pediatrica (0-17) normali e affetti da malattie neurologiche rare. Tale progetto, basandosi su una rete informatica tecnologicamente avanzata (sviluppata e gestita da GARR), permette il collegamento in rete di centri ospedalieri dislocati nel territorio nazionale, la condivisione di dati RM tra centri di eccellenza nell'ambito della neuroradiologia pediatrica per fungere da riferimento sia nell'ambito di specifiche patologie che nella ricerca biomedica pediatrica.

Questa ricerca, a carattere multicentrico, vede la presenza di tre centri clinici ideatori e promotori del progetto: IRCCS Ospedale San Raffaele di Milano, IRCCS "E. Medea" di Bosisio Parini (Lecco) e IRCCS Bambino Gesù di Roma. In aggiunta ad essi, è stato generato un network di 16 centri aggregati, distribuiti su tutto il territorio italiano, che hanno il compito di partecipare alla acquisizione e raccolta delle immagini. Tra questi figurano: IRCCS G. Gaslini di Genova, IRCCS Fondazione Policlinico Mangiagalli di Milano, IRCCS INN Besta di Milano, IRCCS Mondino di Pavia, IRCCS Stella Maris di Calambrone (Pisa), Ospedale Pediatrico Meyer di Firenze, Ospedale dei Bambini "V. Buzzi" di Milano, Ospedali Civili e Ospedale dei Bambini di Brescia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, Ospedale San Salvatore di L'Aquila, Fondazione IRCCS Santa Lucia di Roma, IRCCS Neuromed di Pozzilli (Isernia), Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli, Azienda Ospedaliera Santobono Pausilipon di Napoli, Azienda Ospedaliera Universitaria di Messina e IRCCS Oasi S

Maria di Troina (Enna). Questi centri sono tutti dotati di apparecchiature a RM di ultima generazione o a 3 Tesla o a 1.5 Tesla.

Il progetto Colibrì si pone come obiettivo quello di creare due database di immagini RM pediatriche su bambini tra gli 0 e i 17 anni, uno di malattie rare e l'altro di casi normali.

Il primo database include le RM dell'encefalo di bambini affetti da malattie neurologiche rare. Una malattia è considerata "rara" quando colpisce non più di 5 persone ogni 10.000 abitanti. La loro bassa prevalenza nella popolazione non corrisponde però ad un basso numero di casi, infatti questo è un fenomeno che colpisce milioni di persone in Italia e decine di milioni in tutta Europa, relativamente alle 7000-8000 Malattie Rare conosciute e diagnosticate ad oggi.

Le malattie rare colpiscono in particolar modo la popolazione infantile e fra queste, quelle con coinvolgimento del sistema nervoso centrale si calcola rappresentino circa il 50%, con prevalenza delle singole malattie rare molto variabile. Per molte di queste malattie non sono ancora chiare le cause e per questo risultano importanti la ricerca e una specifica formazione del personale medico. I principali sintomi possono essere ritardo neuromotorio, epilessia, debolezza muscolare, disturbi dell'equilibrio, turbe comportamentali e relazionali, possibile coinvolgimento di altri organi ed apparati. Molte di queste malattie sono spesso degenerative, fortemente invalidanti, con devastante impatto anche familiare, dal momento che viene sovvertito l'atteso naturale processo di sviluppo neuromotorio e cognitivo del bambino. Purtroppo per molte di esse non è ancora disponibile una terapia efficace; sicuramente importanti progressi si stanno facendo sul piano della ricerca nel campo della terapia genica, ad esempio per il trattamento di alcune malattie metaboliche. E' quindi evidente che la gestione di queste patologie è assai complessa sia nella fase diagnostica che di assistenza. In particolare, la diagnosi di una malattia rara è estremamente difficile e in Italia attualmente il ritardo fra il primo segno clinico di malattia e la diagnosi è di circa 3-6 anni per le forme infantili e di 5-10 anni per le forme adulte. Le conseguenze del ritardo diagnostico sono pesanti, innanzitutto perché condizionano, nei casi in cui sia disponibile, un inizio tardivo della terapia. Quando iniziata tardi, la terapia può diventare poco efficace o, se il soggetto si trova ormai in fase avanzata di malattia, l'accesso alle cure può diventare impossibile perché la loro efficacia risulterebbe nulla. In aggiunta, tale ritardo nella diagnosi può determinare l'impossibilità o l'inefficacia di un corretto consiglio genetico e il mancato

accesso alla diagnosi prenatale, quando essa sia possibile. Non va inoltre sottostimata la rilevanza sul piano psicologico e delle aspettative del nucleo familiare di questo periodo angosciante di attesa di inquadramento diagnostico. Infine, il costo per il sistema sanitario nazionale del ritardo diagnostico con prolungamento di questa fase che porta spesso all'utilizzo di esami non adeguati, talvolta ripetuti e non risolutivi, può diventare sicuramente ingente.

Obiettivo principale del database di casi clinici patologici è quello di raggruppare un numero significativo di casi di malattie rare attraverso la collaborazione di centri che si distinguono sul territorio nazionale per eccellenza nel settore della neuroradiologia pediatrica e delle malattie rare. In questo modo un'ampia casistica, acquisita con protocolli standardizzati e condivisi, è messa a disposizione nel web.

Il processo di reclutamento viene effettuato da tutti i centri partecipanti al progetto, su studi pediatrici di interesse. Questi sono ulteriormente suddivisi in studi con diagnosi accertata o studi con diagnosi non ancora certa. I primi, sono inseriti come casi di esempio per la specifica patologia. Nel secondo gruppo vengono inseriti i casi considerati di interesse anche se non si è ancora riusciti a definire una diagnosi certa del quadro patologico, e per questo si richiede la valutazione dagli altri centri partecipanti al progetto.

Il secondo database di soggetti sani si propone invece di raccogliere immagini RM su tomografi 3 T, per la creazione di modelli di riferimento (Atlanti) dell'anatomia normale dell'encefalo durante il suo sviluppo fisiologico nell'intero range pediatrico, cioè 0-17 anni. Questa raccolta è tuttavia complessa poiché, per la creazione di atlanti su un range di età ampio, alla difficoltà di disporre di una popolazione di volontari sani minorenni, si aggiungono problematiche di tipo tecnico. Tali problematiche sono dovute alla necessità di un campionamento effettuato su una cospicua stratificazione dell'età, che renda possibile seguire i repentini cambiamenti volumetrici e maturativi dell'encefalo, quali mielinizzazione e maturazione corticale dei primi anni di vita. La creazione di atlanti di Risonanza a 3 T è di particolare interesse, poiché ad oggi i pochi atlanti pediatrici disponibili in rete [Wilke, 2008; Fonov, 2011; Sanchez, 2012] sono basati su sistemi RM 1.5 T. Poiché l'ambito della ricerca in neuroimaging si sta progressivamente spostando verso l'impiego di campi più alti in relazione alla miglior definizione anatomo-morfologica da essi fornita e poiché l'uso di sistemi a 3 T a scopi

clinici negli ultimi anni ha avuto un forte incremento, appare necessaria la creazione di riferimenti di normalità per l'età dello sviluppo anche per studi effettuati a questi campi magnetici.

Il database di immagini RM in soggetti normali è pertanto focalizzato su studi effettuati con sistemi RM 3 T, in modo da aumentare il numero di immagini di riferimento a questo campo.

1.1.2 Inclusione dei soggetti nei database

Il progetto, secondo quanto appena descritto, prevede il reclutamento del maggior numero di soggetti possibile. Questi sono individuati all'interno del gruppo dei soggetti pediatrici sottoposti a RM per motivazioni cliniche varie. I soggetti vengono suddivisi in soggetti normali e soggetti patologici.

I soggetti normali vengono scelti tra pazienti di età compresa tra gli 0 e i 17 anni, sottoposti per motivi clinici ad una RM a 3 Tesla, risultata poi negativa. I quesiti clinici che permettono l'inclusione di casi normali in assenza di anomalie cerebrali sono, per la maggior parte, accertamenti in merito a disturbi di tipo neurologico quali sincopi comiziali, tremori, difficoltà di deambulazione, controlli seguenti ad un trauma, cefalea o malformazioni e patologie extra encefaliche quali ad esempio il linfangioma oculare, emangioma oculare, sospette ipoplasie del nervo ottico, problematiche cutanee, dolori ossei. Tra questi possono essere inseriti come casi in stand-by quegli studi che presentano caratteristiche cliniche al limite della norma, ma i cui dati clinici non permettono di escludere definitivamente patologie a carico del sistema nervoso e che necessitano di ulteriori valutazioni per accertare il loro stato.

I soggetti patologici invece, nella maggioranza dei casi, accedono all'esame RM quando i medici neurologi, in fase di valutazione di un paziente con anamnesi patologica non certa, decidono di ricorrere all'ausilio dell'imaging RM per la definizione della malattia. Tra questi vengono presi in considerazione i casi di malattie rare le cui peculiarità riscontrabili nelle immagini di risonanza non siano attualmente caratterizzate in maniera molto specifica. In una sezione di questo database vengono raccolti i dati di casi in cui la diagnosi è considerata certa, cioè che al momento dell'esame è già accertata anche a livello genetico tramite appositi test sul DNA. In una seconda sezione invece vengono

raccolti casi in cui l'indagine genetica non è ancora stata effettuata o non ha dato risultati significativi e per cui la diagnosi della patologia risulta ancora in fase di identificazione. Questi pazienti sono stati reclutati come casi patologici di rilevanza, sulla base di un inquadramento clinico e genetico eloquente e in presenza di anomalie encefaliche riscontrate con RM. Questi casi sono ritenuti di interesse e messi a disposizione nel database, con una ipotesi di diagnosi, per una valutazione da parte dei revisori e dai medici specialisti degli altri centri, al fine di creare un gruppo di discussione che porti alla definizione di una diagnosi definitiva.

A supporto delle immagini di risonanza, per tutti i soggetti patologici, sono stati raccolti gli eventuali esiti degli screening genetici o di precedenti esami strumentali effettuati e i dati clinici relativi alla anamnesi del soggetto e della sua famiglia. Questi possono essere consultati come ausilio diagnostico da parte dei revisori che possono richiedere informazioni aggiuntive per definire meglio il caso aumentando la probabilità di giungere ad una diagnosi definitiva.

Per entrambi i database (normali e patologici) il processo di reclutamento dei soggetti è stato suddiviso in una serie di passaggi fondamentali e obbligatori: 1) Le RM vengono caricate sul portale da tutti i centri e vengono proposte allo staff dei revisori del progetto Colibrì; 2) I revisori controllano l'adeguatezza del protocollo di acquisizione rispetto alle indicazioni fornite dal nostro gruppo all'inizio del progetto. In particolare, per i casi normali viene verificata la presenza di tutte le sequenze (T1 3D, T2, DTI) e l'aderenza ai parametri indicati nel protocollo (maggiori informazioni a riguardo saranno presentate nella sezione 1.2); 3) Viene verificata la qualità delle immagini, che devono presentare un contrasto adeguato, assenza di artefatti e un rapporto segnale-rumore sufficiente; 4) Viene controllato l'inserimento delle informazioni relative al caso. Per tutti i soggetti devono essere presenti i dati anagrafici e la motivazione clinica. Per i casi patologici viene valutata la presenza dei dati anamnestici necessari all'inquadramento diagnostico; 5) I revisori forniscono una valutazione del caso dopo la visualizzazione delle immagini e delle informazioni anamnestiche a disposizione. Nel caso dei soggetti patologici esprimono una proposta di diagnosi o una conferma della diagnosi certa. Nel caso dei soggetti normali verificano l'effettiva assenza di patologie; 6) I casi che superano tutti i passaggi di revisione vengono valutati da un revisore finale che, in presenza di una diagnosi univoca, conferma il reclutamento. In questo step, i dati vengono inclusi e resi disponibili in uno dei database.

1.1.3 Criticità

Nell'ambito del nostro progetto si vogliono generare dei pattern che definiscano dei modelli rappresentativi sia delle singole patologie che della normalità. In particolare, nel campo dell'imaging del sistema nervoso centrale nell'età dello sviluppo, la criticità è strettamente legata alla difficoltà di stabilire dei pattern di normalità per le diverse età. Parte di questa difficoltà è dovuta alla impossibilità di concepire dei protocolli di ricerca che arruolino dei volontari sani fra i minori e, di conseguenza, un sufficiente numero di soggetti rappresentativi per ogni età. Un progetto a carattere multicentrico, fa sì che tutti i centri siano in grado di acquisire e condividere le immagini dei casi e le relative informazioni. Se da una parte questo aumenta la probabilità di ottenere un campione più ampio, dall'altra introduce problematiche specifiche di ogni studio multicentrico.

Da un punto di vista tecnico è necessario definire dei protocolli di acquisizione standardizzati che permettano ad ogni centro di ottenere immagini con caratteristiche equivalenti agli altri. Allo stesso tempo, questi protocolli devono rappresentare un compromesso tra l'ottimizzazione dei parametri e la possibilità di poter essere punto acquisiti su macchinari con caratteristiche diverse.

Dal punto di vista della popolazione dei database, sono invece individuate una serie di problematiche relative al reclutamento e all'inserimento dei dati. Perché tutti i centri siano in grado di reclutare soggetti per lo studio è necessario che essi dispongano del consenso informato del paziente all'utilizzo delle immagini. Tale consenso deve essere stato approvato precedentemente dal comitato etico dell'istituto.

Il processo di reclutamento prevede inoltre che ogni centro debba effettuare una pre-selezione dei casi potenzialmente di interesse in modo da poter decidere a priori l'utilizzo del protocollo standardizzato di acquisizione, di recuperare il consenso informato, e tutte le informazioni aggiuntive necessarie.

Alcuni centri possono avere una bassa numerosità di casi reclutati per la difficoltà di arruolare soggetti che rientrino nei criteri di inclusione nello studio, oppure per difficoltà nell'utilizzo del protocollo in ambito clinico.

Per i soggetti sani, il processo che permette l'inclusione di un caso consiste nella verifica della presenza delle sequenze minime del protocollo e della motivazione clinica, in modo da escludere coinvolgimenti a carico dell'encefalo. In alcuni casi, soggetti sani

non potranno essere inclusi perché acquisiti con sequenze i cui parametri sono stati erroneamente modificati o su macchinari a campo 1.5 T. In altri, potrebbe non essere stata acquisita una sequenza richiesta (ex. DTI) e il caso potrà essere incluso solo se le altre due immagini siano state acquisite seguendo il protocollo.

Per i soggetti patologici, devono essere verificate sia le sequenze di acquisizione, che devono essere adeguate per la definizione del caso, sia le informazioni anamnestiche relative al soggetto. Accade infatti, che durante l'inserimento dei dati relativi al paziente non siano indicate informazioni necessarie alla corretta definizione della diagnosi, come ad esempio le indagini genetiche, esami precedenti o dati relativi all'inquadramento del caso. A volte invece i revisori possono segnalare l'assenza di immagini che da un punto di vista clinico sono utili a confermare o escludere ipotesi diagnostiche dubbie.

Il processo di reclutamento, revisione e inclusione dei casi è particolarmente lungo e complesso e risulta ulteriormente complicato a causa della non uniformità di presentazione dei dati. Quando i dati e le informazioni fornite riguardo ad un caso non sono sufficienti e conformi allo standard richiesto, lo staff di revisione può richiedere l'aggiunta di informazioni per il completamento del caso. In seguito, il processo di revisione dovrà essere nuovamente eseguito, allungando i tempi di inclusione dei casi e limitando il processo di popolamento dei database.

1.1.4 Il ruolo del progetto di dottorato in Colibrì

Questo progetto di dottorato si inserisce all'interno del progetto Colibrì in relazione al suo secondo scopo, la creazione di atlanti di normalità (o template) ovvero delle immagini che rappresentano il cervello medio dei bambini alle diverse età. Questo intento è particolarmente ambizioso, poiché si prefigge di creare dei template che siano in grado di coprire l'intero periodo di sviluppo pediatrico, dalla nascita all'età adulta, utilizzando immagini acquisite in tre pesature RM differenti e complementari: T1, T2 e DTI. Al momento, non sono ancora stati sviluppati e messi disponibili in rete degli atlanti con queste caratteristiche e dunque non esistono riferimenti anatomici con questo grado di completezza che possano essere utilizzati da neuroradiologi pediatrici.

Il progetto di dottorato si pone dunque l'obiettivo di creare questi template.

Tale obbiettivo comprende diversi step: 1) la definizione del protocollo di acquisizione, necessario per ottenere delle immagini che possano essere elaborate insieme, 2) l'implementazione del metodo di registrazione e normalizzazione delle immagini, 3) la creazione vera e propria dei template.

In questa parte del lavoro di dottorato inizialmente sono state studiate e valutate diverse metodologie presenti in letteratura per la generazione di atlanti in ambito pediatrico. Lo sviluppo della metodologia è stata strettamente dipendente dalle caratteristiche delle immagini acquisite e dalle proprietà che vogliono essere conferite agli atlanti. È stato quindi implementato un metodo caratterizzato da una importante versatilità in modo da fronteggiare la ampia variabilità dei dati a disposizione e mantenere lo stesso processo di elaborazione delle immagini, al fine di ottenere risultati consistenti.

1.2. Il protocollo di acquisizione

1.2.1 Lo sviluppo cerebrale

Lo sviluppo dell'encefalo avviene attraverso un processo molto complesso che ha inizio ancora prima della nascita, dal periodo fetale, per concludersi con l'età adulta. Già dalla dodicesima settimana gestazionale, infatti, è possibile riconoscere i primi sistemi di fibre che costituiscono le connessioni anatomiche attraverso le principali strutture cerebrali. Una prima fase di accrescimento, che viene portata a termine entro la nascita, consiste nella generazione delle connessioni per l'espletamento delle funzioni innate basilari in modo che il neonato sia in grado di sopravvivere autonomamente all'esterno dell'ambiente uterino. Dopo la nascita, anche grazie agli stimoli esogeni a cui il bambino viene sottoposto, il processo di sviluppo e maturazione dell'encefalo procede attraverso fasi caratterizzate da numerose modificazioni che lo accompagneranno verso la conformazione tipica dell'età adulta.

Le tappe di maturazione cerebrale, durante le quali l'individuo è in grado di acquisire nuove capacità, corrispondono all'acquisizione di determinate caratteristiche dal punto di vista anatomico e strutturale. In particolare, nell'intervallo che intercorre tra la nascita e i primi tre anni di vita dell'individuo, ha luogo un processo di sviluppo molto rapido, che porta l'encefalo a modificare le sue caratteristiche in maniera sostanziale passando dalla conformazione immatura, quale quella alla nascita, ad una più simile a quella di un adulto. Questo processo avviene parallelamente nella sostanza bianca (connessioni anatomiche) e nella sostanza grigia (aree cerebrali). Da un lato, esso consiste nella creazione dei sistemi di fibre di sostanza bianca che costituiscono le connessioni strutturali dell'encefalo, nella loro organizzazione e infine nella loro maturazione. Dall'altro, si osserva l'accrescimento e la maturazione della sostanza grigia, caratterizzate dalla generazione di un alto numero di sinapsi.

Come precedentemente descritto, alla nascita la maggior parte dei sistemi di fibre sono già presenti, donando all'encefalo un aspetto di completa connessione. Tuttavia, questi sistemi di fibre continuano il loro sviluppo e modificano le loro caratteristiche in maniera molto significativa nei primi mesi e nei primi anni di vita, ma il processo si conclude solamente alla fine dell'adolescenza. Durante questo periodo infatti, avvengono parallelamente due processi principali, la modifica della conformazione delle connessioni, con un complessivo effetto di ridistribuzione delle connessioni in

modo più focalizzato ed efficiente, e la mielinizzazione delle fibre. La conformazione delle connessioni si modifica in maniera sostanziale nei primi anni di vita. Nelle ultime settimane di gestazione e nei primi mesi di vita si ha infatti una sovra produzione di neuroni e sinapsi che costituiscono le fibre di connettività strutturale. In seguito, si assiste a apoptosi cellulare, retrazione assonale e pruning sinaptico, che provoca una riduzione del numero di queste connessioni. Questi processi di sovra produzione ed eliminazione sono essenziali e conferiscono all'encefalo dei neonati e dei bambini una forte caratteristica di plasticità, permettendo il riarrangiamento delle reti funzionali durante tutto il periodo dello sviluppo [Stiles, 2010]. È durante questo periodo in cui si assiste anche allo sviluppo del subplate, una sottile lamina sottocorticale, che costituisce un ponte nello sviluppo delle fibre talamo-corticali verso la corteccia. Questo processo è caratterizzato dalla creazione di un alto numero di fibre di connessione con l'area corticale di target, seguito poi da un processo di pruning per la creazione delle connessioni più forti e focalizzate, indirizzate all'aumento dell'integrazione tra aree funzionalmente specializzate [McConnell, 1989; Huttenlocher, 1991]. La mielinizzazione, invece, corrisponde alla progressiva creazione della guaina mielinica lungo gli assoni che costituiscono le fibre. Questo processo svolge un ruolo fondamentale all'interno della connettività cerebrale in quanto la mielina, costituendo una guaina isolante lungo l'assone neuronale, permette una conduzione più veloce degli impulsi elettrici che vengono trasmessi. La progressiva mielinizzazione coincide quindi con un aumento della connettività tra le aree connesse dai tratti di fibre che, a causa del colore caratteristico indotto dalla mielina, prendono il nome di materia bianca (White Matter, WM). Il processo di mielinizzazione viene a sua volta suddiviso in due step, uno chiamato pre-mielinizzazione, in cui le cellule che costituiranno la mielina si depositano avvolgendo gli assoni, e la mielinizzazione vera e propria, in cui la avviene la maturazione chimica della mielina, che induce degli effetti sia sulla conduzione dei segnali elettrici che sulla compartimentazione dell'acqua contenuta nei tessuti cerebrali [Poduslo, 1984; Barkovich, 1988]. Infatti, l'introduzione di una barriera lipidica intorno agli assoni genera un vincolo sulla diffusione delle molecole d'acqua intra ed extracellulare, che risulta, nella direzione trasversale rispetto all'assone molto lenta e limitata e molto veloce in una direzione preferenziale parallela alla propagazione della fibra. Questa diffusione caratterizzata da una marcata direzione preferenziale prende il nome di diffusione anisotropa e può essere utilizzata per la descrizione della WM. E' necessario sottolineare come il processo di mielinizzazione non avvenga in maniera

sincrona in tutto l'encefalo, ma abbia un picco durante il primo anno di vita e un pattern di progressione da zone più centrali verso la periferia. Esso inizia nelle zone del tronco encefalico e del cervelletto già in età fetale, per continuare dopo la nascita attraverso la maturazione progressiva che parte da zone prossimali dando precedenza a tratti associati a funzionalità più basilari, come quelli sensitivi (somatosensoriale, visivo, uditivo), prosegue in quelli motori e infine lungo tratti e regioni correlate a funzionalità più elevate (associative, di linguaggio, cognitive) la cui maturazione definitiva avviene durante il periodo adolescenziale [Kinney, 1988].

Parallelamente alla maturazione della WM avviene anche lo sviluppo della materia grigia (Gray Matter, GM), di cui sono costituite numerose zone dell'encefalo, come ad esempio la regione cerebrale corticale dell'encefalo, il cervelletto e numerose aree profonde, come talamo, ipotalamo, putamen e gangli della base. La materia grigia, a differenza della materia bianca, è caratterizzata da una assenza di mielinizzazione, dovuta ad una organizzazione cellulare costituita da un elevato numero di soma cellulari, dendriti e sinapsi. Per questo motivo, non essendo presenti barriere che ne limitano la direzione di movimento, la diffusione delle molecole di acqua intra ed extracellulare avviene in un ambiente meno vincolato ed è caratterizzata da maggiore isotropia. Durante lo sviluppo della GM, dalla nascita si assiste ad un progressivo accrescimento della corteccia cerebrale. Un aumento dello spessore corticale e della numerosità e profondità delle circonvoluzioni avviene durante l'infanzia, fino al raggiungimento della massima espansione sinaptica che ha luogo tra il primo e secondo anno di età. In seguito, dopo un periodo di stabilità, a partire dalla pubertà la corteccia comincia a subire un effetto di perdita di volume, corrispondente alla sua fase di maturazione. Poiché le regioni della GM svolgono un compito funzionale, il suo processo di maturazione corrisponde allo sviluppo funzionale delle aree corticali e profonde e ad una loro progressiva specializzazione. Per quanto riguarda la corteccia, il processo di maturazione è caratterizzato da step differenti e ha inizio in giovane età nelle aree preposte a funzioni primarie, quali, ad esempio le aree sensorimotorie primarie, le frontali legate all'olfatto e al gusto e le occipitali legate a funzionalità visive primarie. In seguito, la maturazione avviene verso le aree frontali, temporali e occipitali, dove sono collocate aree preposte a funzionalità associative di alto livello (linguaggio, semantica, cognizione, introspezione, attenzione, coscienza di sé, coordinazione visuo-motoria, etc) che si sviluppano con un maggiore ritardo, concludendosi nel periodo terminale dell'adolescenza [Gogtay, 2004]. Le cause che inducono una diminuzione di densità

della GM durante la maturazione non sono del tutto conosciute, ma possono essere ricondotte, almeno parzialmente, ad alcuni fattori. Tra questi vengono annoverate modifiche relative ad un aumento della profondità dei solchi e ad una maggiore presenza di girificazioni. Si pensa inoltre che questo processo possa essere parzialmente guidato dal pruning delle sinapsi della corteccia unitamente ad effetti di trofismo, disidratazione cellulare e modificazioni vascolari [Huttenlocher, 1979; Huttenlocher, 1997; Bourgeois, 1997]. E' interessante notare come la maturazione avvenga seguendo le medesime tappe della mielinizzazione, sia nelle aree funzionali primarie (motorie, uditive, visive) che nelle regioni frontali e dorsolaterali prefrontali. I due processi di sviluppo della WM e della GM, si svolgono parallelamente dimostrando come essi siano complementari, ma strettamente correlati anche da un punto di vista strutturale.

1.2.2. Le fasce di età

Sulla base delle modificazioni dell'encefalo descritte nel paragrafo precedente, il progetto relativo alla creazione degli atlanti RM di soggetti normali ha reso necessaria la definizione di fasce di età attraverso le quali suddividere l'intero range pediatrico dei soggetti reclutabili per il database. Infatti, lo sviluppo così rapido dell'encefalo fa sì che i dati RM acquisiti abbiano caratteristiche molto diverse a seconda dell'età del bambino sottoposto all'esame. Di conseguenza, per avere dati omogenei che possano essere elaborati per generare gli atlanti è stato necessario definire delle fasce di età, ognuna delle quali caratterizzata da dati simili e tramite le quali sia possibile monitorare e studiare le varie tappe di sviluppo. A questo fine, l'intero intervallo temporale di sviluppo cerebrale pediatrico tra 0 e 17 anni è stato suddiviso in sei fasce. Una prima divisione è stata effettuata tenendo conto dei cambiamenti indotti dalla modifica della composizione del tessuto, quali la densità delle fibre, l'ispessimento della corteccia, l'aumento della girificazione, l'effetto del pruning e la mielinizzazione. Si possono quindi individuare quattro fasi principali (fig. 1.1): il periodo neonatale (0-3 mesi), l'incipit di mielinizzazione (3-12 mesi), il periodo di completamento della mielinizzazione (1- 3 anni), la fase di maturazione post mielinizzazione (3-17 anni).

Il segnale RM, è strettamente dipendente dalla quantità di acqua contenuta nei tessuti e la diversa composizione delle strutture anatomiche permette di individuarle e descriverle. La pesatura T1 è in grado di mettere in risalto i tessuti con una bassa componente d'acqua, come i lipidi che costituiscono la guaina mielinica, e quindi di seguire il processo di mielinizzazione. Al contrario, la pesatura T2 è in grado di mettere in risalto le componenti liquide e permette di discernere in maniera più accurata tra i tessuti cerebrali nei neonati, dove la componente acquosa è preponderante sia nella materia grigia che nella materia bianca. Di conseguenza durante il processo di sviluppo, dove la composizione tissutale si modifica in maniera significativa, la definizione dei range proposti, permette di individuare le modifiche significative nel segnale acquisito tramite imaging, in particolare relativamente a WM e GM. In questo modo, tramite una acquisizione mirata, è possibile discriminare tra le diverse strutture anatomiche in ogni fase dello sviluppo.

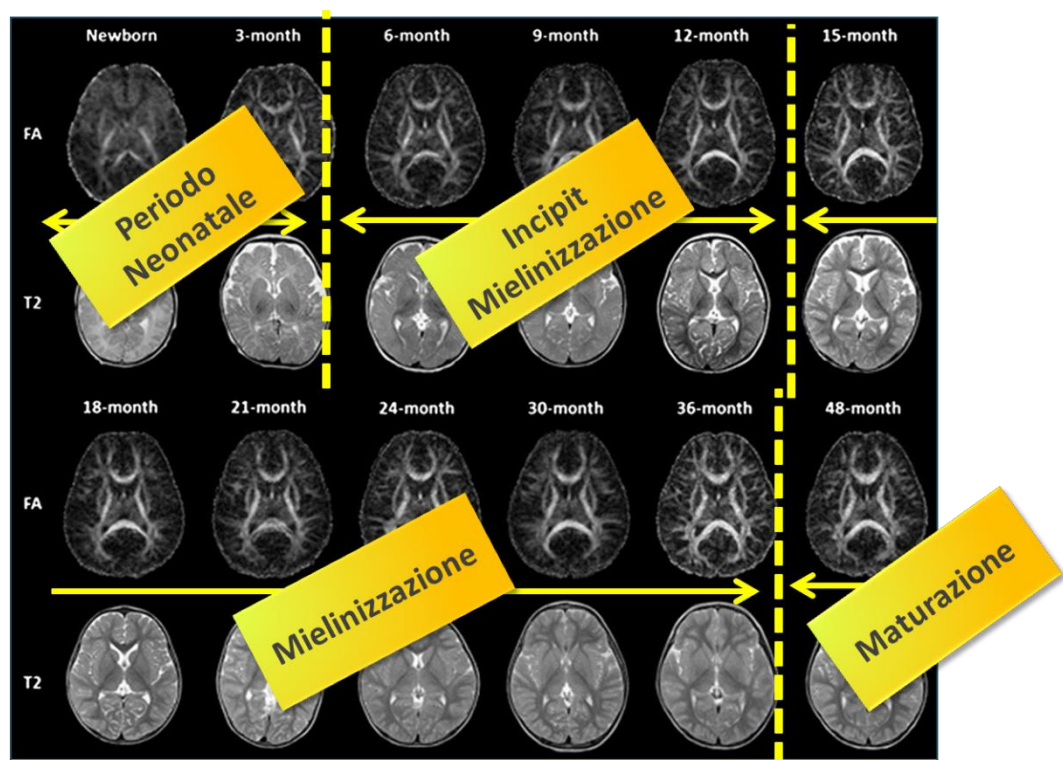


Figura 1.1. Fasi principali dello sviluppo cerebrale

Allo stesso tempo per la definizione degli intervalli di età , oltre alle modifiche di composizione dei tessuti, è stato tenuto conto dei casi in cui, a fronte di una modifica non significativa della composizione dei tessuti, la variabilità della forma e della

dimensione dell'encefalo e delle strutture cerebrali è elevata. In questo modo, si è stata resa necessaria un'ulteriore suddivisione, in particolare per poter aumentare progressivamente le dimensioni del campo di vista dell'immagine (FOV), dello spessore delle fette e del numero delle fette acquisite nel piano principale di acquisizione ed effettuare un adeguamento delle dimensioni dei voxel dell'immagine. Per tenere conto di tutte le modifiche che intervengono durante la crescita sia nella composizione dei tessuti che nella dimensione, sono quindi state definite 6 classi d'età corrispondenti ai range: 0-3 mesi, 3-12 mesi, 1 – 2 anni, 2-3 anni, 3-6 anni, 6-17 anni. In base a queste fasce di età, sono stati generati protocolli di acquisizione ottimizzati per ogni età e per ogni pesatura di immagine.

1.2.3. L'imaging RM nello sviluppo cerebrale

L'imaging a Risonanza Magnetica permette di ottenere in maniera non invasiva immagini che descrivono l'anatomia e la funzionalità dei tessuti, sfruttando il loro comportamento in presenza di campo magnetico e stimolazioni elettromagnetiche. Queste immagini vengono ottenute tramite bobine a radiofrequenza del macchinario RM che mediante l'impiego di campi magnetici statici e radiofrequenze sono in grado di eccitare in modo selettivo i tessuti e di registrare il segnale ottenuto in risposta [Lauterbur, 1973]. Poiché il segnale registrato viene generato dai nuclei di idrogeno in seguito all'eccitazione, i tessuti molli e caratterizzati da un ricco contenuto di acqua sono molto adatti ad essere studiati in RM. Per la creazione delle immagini sono utilizzate delle tecniche di acquisizione chiamate sequenze di impulsi che consentono di generare dei contrasti di segnale e permettono di distinguere e caratterizzare tessuti diversi. Tra le sequenze più utilizzate, quelle pesate nelle costanti di rilassamento T1 e T2 [Bloembergen, 1947; Saunders, 2007; Parizel, 2010] sono sempre presenti in un protocollo clinico e permettono di definire con precisione anatomia e composizione dei tessuti, come la percentuale di acqua e la presenza di mielina.

La risonanza magnetica viene ormai impiegata ad ampio raggio nello studio del sistema nervoso centrale in ogni categoria di soggetti: sani e patologici, adulti, bambini e neonati. La diffusione dell'utilizzo della RM in ambito pediatrico, anche in percentuale maggiore rispetto ad altre tecniche diagnostiche, è dovuta alla sua caratteristica di non invasività in quanto non utilizza radiazioni ionizzanti. Inoltre, rispetto ad altre modalità

di imaging permette di ottenere informazioni molto diverse tra loro (anatomiche, fisiologiche, funzionali, metaboliche) che possono essere utilizzate in maniera complementare, pur mantenendo una risoluzione spaziale molto elevata, un buon contrasto tra WM e GM, e tra i tessuti sani e patologici. Nonostante i numerosi punti di forza di questa metodologia che la rendono particolarmente apprezzata, bisogna però tenere conto delle criticità relative al suo impiego in una popolazione pediatrica, principalmente legate alla interazione tra i bambini e l'ambiente risonanza. Innanzitutto, bisogna puntualizzare che i bambini non sono e non possono essere considerati come degli adulti in scala ridotta, a partire dalle differenze nella composizione dei tessuti e dalla collaborazione che possono offrire durante l'esecuzione dell'acquisizione. Ad esempio, un bambino sottoposto a RM non sarà probabilmente in grado di rimanere fermo per tutta la durata dell'esame. Per questo motivo, al fine di ridurre gli artefatti da movimento e i tempi di acquisizione, in bambini che non possono essere considerati collaborativi (generalmente fino all'età scolare) l'esame viene effettuato durante il sonno, naturale per i neonati e indotto tramite l'utilizzo di sedazioni farmacologiche per i bambini più grandi. Per bambini in età scolare, un accompagnamento psicologico e la visione di video durante lo scan vengono utilizzati per distrarre l'attenzione dal macchinario e minimizzare i movimenti del bambino dovuti alla paura o alla noia.

Dal punto di vista tecnico sono poi molte le particolarità di cui è indispensabile tenere conto. Ad esempio, oltre alla definizione di campi di vista (Field Of View, FOV) più ristretti, è necessario l'utilizzo di una bobina ottimizzata sulle dimensioni e le caratteristiche dell'encefalo pediatrico. In questo modo è possibile acquisire immagini qualitativamente soddisfacenti, caratterizzate da una ampiezza e una omogeneità di segnale adeguate, in tempi di acquisizione limitati, che altrimenti con l'utilizzo di strumenti inappropriati verrebbero dilatati nel tentativo di raggiungere un rapporto segnale-rumore sufficiente.

Nella acquisizione di immagini RM sui soggetti pediatrici, un ruolo fondamentale è svolto dalla definizione dei parametri delle sequenze di acquisizione. Questi devono essere definiti in modo da ottimizzare le pesature in T1 e T2, tenendo conto delle modifiche che lo sviluppo induce su questi parametri. La costante T1, è particolarmente sensibile alla quantità d'acqua contenuta nei tessuti ed è quindi particolarmente indicata per la descrizione della WM, dove la componente acquosa viene sostituita da quella lipidica. T1 è caratterizzata da valori più elevati in presenza di alte quantità d'acqua e

raggiunge valori massimi nei liquidi, mentre vengono rilevati valori minimi in assenza di acqua, come ad esempio in tessuti caratterizzati da un'alta concentrazione di lipidi. Particolare è il comportamento dei solidi, infatti superata una soglia di densità strutturale la costante T1 torna a crescere raggiungendo nuovamente il massimo nei solidi cristallini, come ad esempio nell'osso (in figura 1.2). La costante T2, come la T1, è altamente sensibile alla quantità d'acqua nei tessuti: i liquidi e i tessuti ad alto contenuto acquoso sono caratterizzati da una T2 molto lunga, mentre con l'aumentare della densità del tessuto la costante T2 diminuisce, così che i tessuti lipidici sono caratterizzati da una T2 molto corta e i solidi cristallini da una T2 minima.

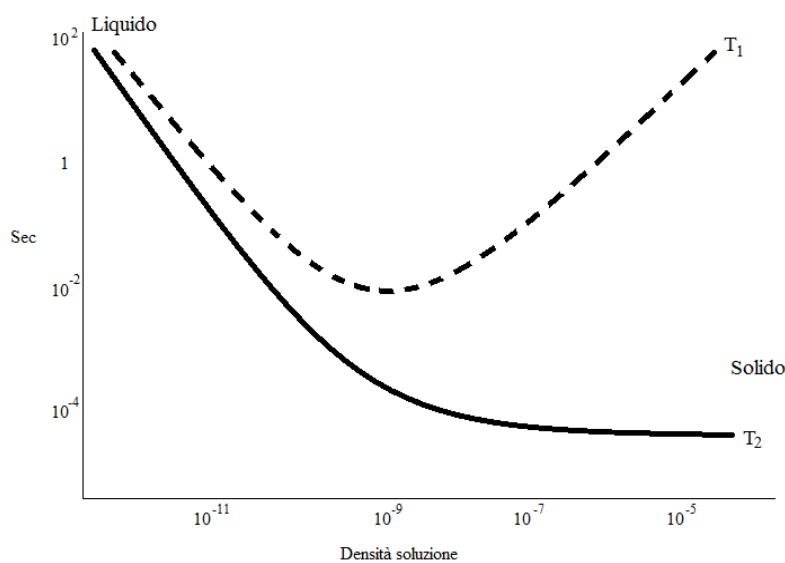


Figura 1.2. Grafico dell' andamento delle costanti T1 e T2 in funzione della densità di una soluzione. La soluzione formata da acqua e glicerina a densità crescente permette di modellizzare i tessuti. Il minimo della curva T1, corrisponde alla densità del grasso e dei tessuti adiposi.

Durante il processo di mielinizzazione, la composizione della materia bianca si modifica in maniera significativa, con una sensibile diminuzione della componente d'acqua che viene sostituita dalla guaina mielinica, composta da molecole di colesterolo [Van der Knaap, 1990]. In questo periodo si osserva quindi una veloce diminuzione del valore di T1 che dal valore massimo rilevato nel periodo neonatale va ad assestarsi su un valore vicino al minimo in corrispondenza del termine della fase di mielinizzazione, intorno ai 3 anni di età (in figura 1.3 è mostrato l'andamento delle due costanti nel primo anno di età). Durante il periodo di maturazione, con il completamento della mielinizzazione degli ultimi fasci di fibre, il valore di T1 è caratterizzato da una

ulteriore diminuzione più lenta verso il valore che viene raggiunto al termine della adolescenza quando l'encefalo è giunto a completa maturazione.

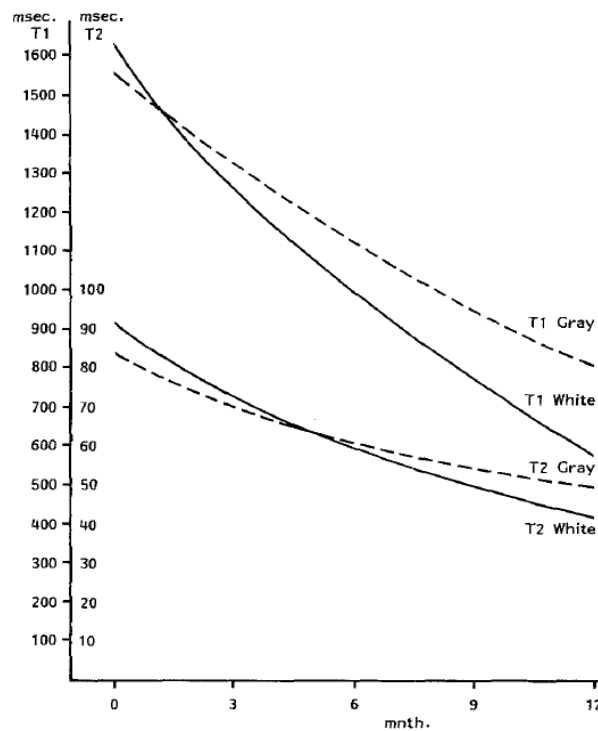


Figura 1.3. Andamento delle costanti T1 e T2 nella WM e GM nel primo anno di età [Van Der Knaap, 1990]

Come per la costante T1, durante le diverse fasi dello sviluppo dell'encefalo si osservano cambiamenti nei valori della costante T2, che con l'aumentare dell'età è caratterizzata da una riduzione della lunghezza di T2 in relazione alla diminuzione della quantità d'acqua dei tessuti, anche se meno significativa rispetto a quanto osservato per la T1 (fig 1.4).

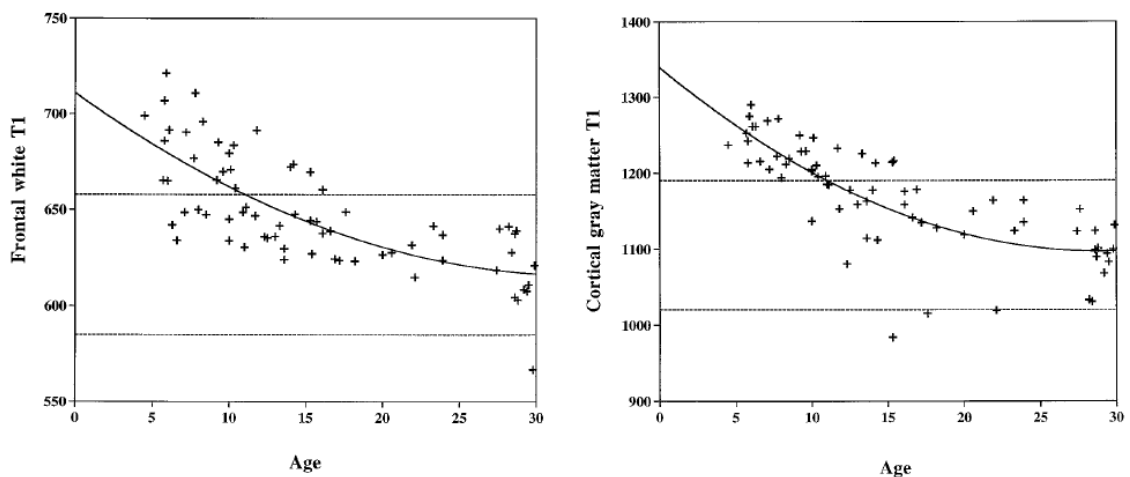


Figura 1.4. Esempio di andamento della costante T1 rispetto all'età, in una ROI esemplificativa della WM e della GM corticale. [Steen, 1997]

Nelle immagini, le costanti T1 e T2 vengono associate a segnali di intensità proporzionale alla loro lunghezza caratteristica. In particolare, mentre il segnale legato alla costante T2 è direttamente proporzionale al valore della costante e quindi valori di T2 più lunghi corrispondono a segnali più forti, il segnale legato a T1 è inversamente proporzionale al valore della costante, dove valori di T1 lunghi corrispondono ad un segnale debole, mentre valori di T1 corti corrispondono a un segnale forte. A mielinizzazione completata, l'encefalo presenta caratteristiche di intensità molto definite, infatti in immagini pesate T1, dove il segnale più forte è legato a valori bassi della costante, le intensità risultano massime nella materia bianca, molto ricca di colesteroli, mentre la materia grigia, caratterizzata da una maggiore componente acquosa presenta una intensità minore. In immagini pesate T2, dove al contrario il segnale è proporzionale al valore della costante, la materia bianca, con valori di T2 bassi sarà caratterizzata da bassa intensità, mentre la materia grigia, con valori di T2 maggiori sarà caratterizzata da valori di intensità maggiori. Durante le diverse fasi di sviluppo cerebrale la modifica delle costanti T1 e T2, produce immagini caratterizzate da intensità e contrasti molto differenti [Welker, 2012]. Il pattern simile a quello dell'adulto si presenta infatti solo a partire dai 12 mesi di vita, quando la mielinizzazione è già in fase di avanzamento. Da questa età la componente lipidica degli assoni permette di utilizzare il contrasto T1 per definire i tratti di WM, con un contrasto tra WM e GM che aumenta con la progressione della mielinizzazione. Dei contrasti molto differenti si osservano invece in entrambe le pesature durante i primi 12 mesi di vita. Tra gli 0 e i 6 mesi, l'alta componente acquosa in entrambi i tessuti corrisponde ad alti valori di T1 e T2, che rendono preferibile l'utilizzo di immagini pesate in T2 per la descrizione dell'anatomia cerebrale, dove è possibile apprezzare una differenza dei due tessuti, anche se con un contrasto inverso rispetto a quello degli adulti. Particolarmente critico risulta invece il periodo compreso tra i 6 e i 12 mesi, dove le costanti T1 e T2 della materia bianca e grigia hanno valori tali da ottenere immagini con scarso contrasto.

Un altro aspetto interessante da considerare è quello relativo alla diffusione dell'acqua nei tessuti, che non dipende da costanti di rilassamento, ma dalla conformazione strutturale dei tessuti. La diffusione dipende infatti dal tipo di cellule che compongono il tessuto, dalla densità cellulare e dalla presenza di barriere che ostacolano la

propagazione delle molecole. L'osso e i solidi cristallini ad esempio sono caratterizzati da una altissima densità e dalla mancanza di diffusione, mentre strutture composte da liquidi, come nei ventricoli cerebrali, sono caratterizzati da diffusione massima anche grazie alla assenza di ostacoli. La materia grigia è composta da un'alta quantità di molecole d'acqua, che sono libere di muoversi in maniera isotropa all'interno del tessuto, ma la cui diffusione risulta in parte limitata dalla elevata concentrazione dendritica che genera resistenza alla diffusione. Strutture composte da lipidi hanno invece la caratteristica di creare una barriera che non permette il passaggio dell'acqua, come nel caso della materia bianca, dove la guaina mielinica degli assoni consente la diffusione dentro e fuori dagli avvolgimenti di colesteroli, ma non attraverso, generando un ostacolo alla diffusione nella direzione perpendicolare all'asse di propagazione delle fibre. La diffusione media delle molecole d'acqua all'interno del fascio risulta relativamente alta, ma caratterizzata da una direzione preferenziale, parallela all'asse delle fibre, e quindi fortemente anisotropa. Le tecniche RM di Diffusione (Diffusion weighted imaging , DWI) [Le Bihan, 1985] sfruttano l'effetto, sul segnale RM, della diffusione delle molecole di acqua nei diversi tessuti, caratterizzandoli. A fronte dell'applicazione di un gradiente di campo magnetico lungo una certa direzione, è possibile misurare l'attenuazione del segnale dovuto alla maggiore o minore mobilità delle molecole lungo quella direzione calcolabile secondo la seguente equazione:

$$S = S_0 e^{-bD} \quad (1)$$

dove S_0 è l'intensità del segnale non pesato in diffusione, D è il coefficiente di diffusione, spesso sostituito dal coefficiente di diffusione apparente (apparent diffusion coefficient, ADC) e b rappresenta il b-value, un indice che riflette le caratteristiche di ampiezza (forza), durata e intervallo tra gli impulsi dei gradienti.

Inoltre, mediante tecniche tensoriali di diffusione (Diffusion tensor Imaging, DTI) [Le Bihan, 1985; Le Bihan, 2001] è possibile analizzare non solo la diffusività media nel tessuto, ma anche le direzioni di propagazione dei liquidi all'interno dell'encefalo e studiare dove la diffusione avviene in modo simile in tutte le direzioni (diffusione isotropa) e dove c'è un maggiore vincolo sulla direzione della diffusione (diffusione anisotropa). In questo modo, studiando gli indici di diffusione media (Mean Diffusivity, MD) e anisotropia frazionaria (Fractional Anisotropy, FA), è possibile ricostruire delle mappe che descrivono le caratteristiche dei tessuti e forniscono informazioni strutturali.

Questo risulta particolarmente interessante nell'ambito dello studio dello sviluppo cerebrale, perché i cambiamenti di composizione dei tessuti si riflettono sui valori di MD e FA e permettono di ottenere una misura quantitativa riguardante il processo di maturazione dell'encefalo. Ad esempio, l'encefalo neonatale è caratterizzato da un alto valore di MD sia nella materia bianca che nella materia grigia, mentre con l'aumentare dell'età il valore di MD diminuisce in entrambi i tessuti, a causa di una riduzione nella concentrazione di acqua, con una diminuzione più significativa nella WM [Huppi, 2006]. La FA ha invece un trend differente nei due tessuti. La materia grigia corticale nella fase prenatale e nel periodo di maturazione della GM è caratterizzata da una diffusione anisotropa in direzione radiale. Questa anisotropia riflette l'organizzazione radiale dei dendriti delle cellule che costituiscono la corteccia immatura, causando una limitazione alla diffusione dell'acqua in direzione parallela alla superficie corticale. Con lo sviluppo, i dendriti dei neuroni dell'asse talamo-corticale si sviluppano invece in direzione orizzontale, parallelamente alla superficie della corteccia, e generando una riduzione di diffusione più omogenea in tutte le direzioni [McKinstry, 2002]. Si assiste quindi ad un andamento di progressiva diminuzione del valore di FA fino al termine dello sviluppo, quando la configurazione cellulare conferisce al tessuto la caratteristica di diffusione isotropica e il valore di FA diventa pressoché nullo (figura 1.5). Nella materia bianca si assiste invece ad un andamento opposto in cui nel periodo prenatale il tessuto presenta caratteristiche isotrope, mentre con lo sviluppo acquisisce progressivamente caratteristiche di diffusione anisotropa. La FA presenta quindi un trend di crescita che persiste lungo tutto l'arco dello sviluppo e che risulta strettamente legato al processo di mielinizzazione, che vincola la direzione di diffusione ad essere predominante in una determinata direzione. Con l'aumento dell'età si osserva quindi un aumento del valore di FA all'interno delle fibre di WM: gli alti valori dell'indice, che alla nascita sono individuabili solo nelle poche fibre profonde già mielinizzate come corpo calloso, capsula interna, peduncoli cerebellari [Partridge, 2004], si propagano lungo tutte le fibre descrivendo la progressione nella maturazione della materia bianca nell'encefalo [McGraw, 2002; Oishi, 2011; Yoshida, 2013; Dubois, 2014].

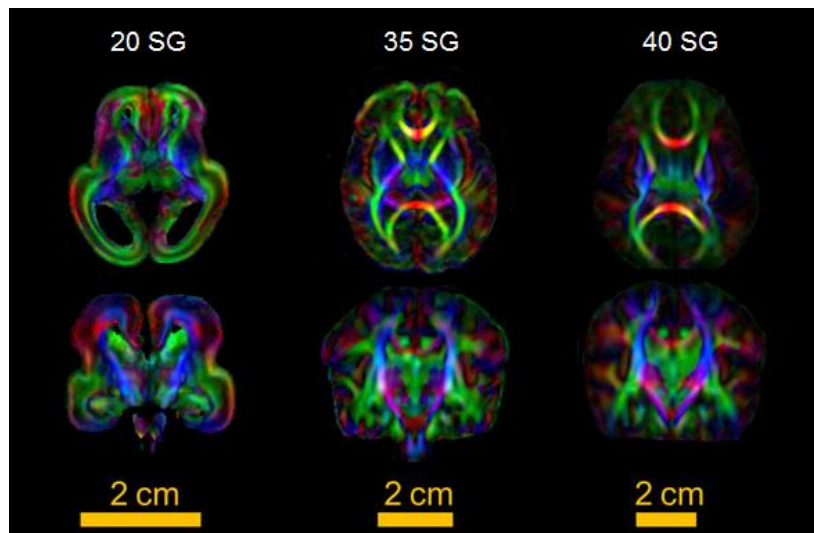


Figura 1.5. Cambiamenti FA nella materia grigia e nella materia bianca nel periodo prenatale [Yu, 2015]

1.2.4. Definizione di protocolli per l'acquisizione di casi normali

Durante la definizione dei protocolli e dei parametri, particolare attenzione è stata rivolta al contesto in cui queste immagini vengono acquisite e alle criticità che questo introduce. Il progetto è infatti un progetto multicentrico e implica che le immagini siano acquisite su tomografi differenti, con caratteristiche intrinseche differenti. Le sequenze inserite nel protocollo sono state determinate in modo da essere facilmente riproducibili da tutti i centri su tutti i tomografi e in modo da contenere i tempi di acquisizione sui bambini, che molto spesso sono in grado di fornire una collaborazione solo limitata. In particolare, per la generazione dei template dei soggetti sani, sono stati definiti protocolli che permettono di descrivere l'anatomia cerebrale secondo tre pesature differenti: T1, T2 e DTI. Queste immagini, acquisite su tutti i soggetti, sono elaborate e sottoposte ad operazioni di media ed è quindi indispensabile che posseggano caratteristiche analoghe in termini di qualità, contrasto e geometria, anche a costo di ricorrere a compromessi fra qualità, rapidità e semplicità. Parametri univoci ottimizzati su un solo tipo di scanner, permetterebbero un risultato ottimale sul singolo macchinario, ma non garantiscono di ottenere immagini di qualità e caratteristiche comparabili. La definizione dei parametri è quindi stata effettuata individuando dei parametri che potessero essere compatibili con le caratteristiche di tutti i tomografi dei gruppi partecipanti al progetto e che potessero generare sempre immagini di buona qualità.

La modifica delle costanti di rilassamento visibili in RM (T1, T2) e delle caratteristiche di diffusività dell'acqua (FA, MD), rendono necessaria la definizione di sequenze di acquisizione specifiche, per ottimizzare la visualizzazione delle strutture cerebrali durante tutto il periodo pediatrico ed ottenere il miglior contrasto possibile tra i diversi tessuti. I valori dei parametri utilizzati negli adulti, dove la T1 è caratterizzata da TR e TE brevi e la T2 è caratterizzata da TR e TE lunghi, non possono essere utilizzate nei bambini, in quanto le immagini ottenibili hanno scarso contrasto (fig. 1.6).

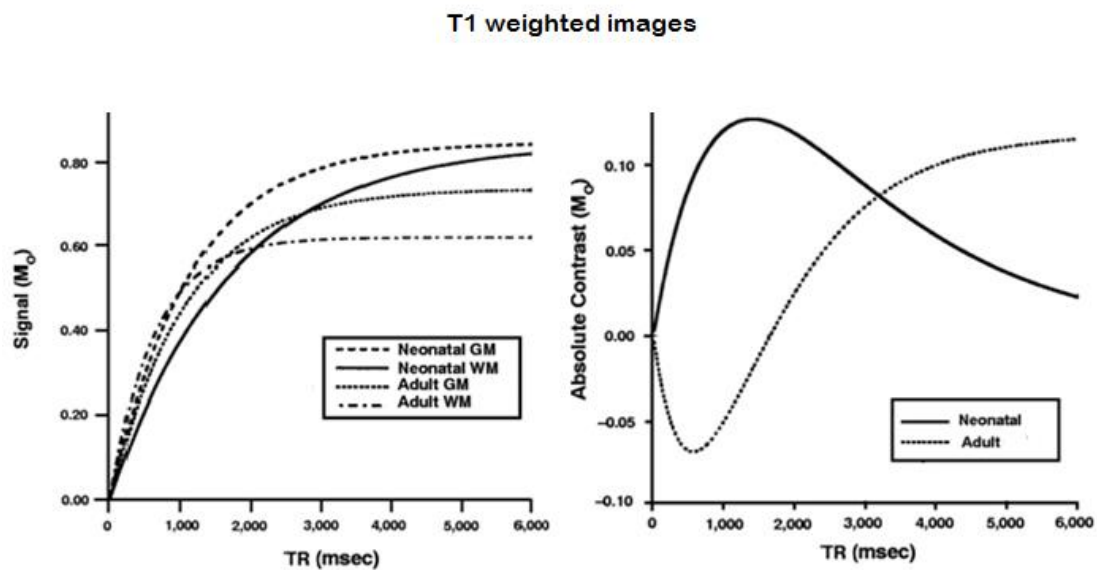


Figura 1.6. Andamento del segnale e del contrasto in una immagine pesata T1 (TE=10ms). Nella immagine vengono confrontati i valori relativi aneonati ed adulti sia per la WM che la GM.

[Jones, 2004]

Per esempio, nell'infanzia le immagini pesate T1 sono caratterizzate da una rumorosità intrinseca causata dalla alta percentuale acquosa della materia cerebrale, che contraddistingue questo contrasto indipendentemente dalla forza del campo magnetico utilizzato. Un tentativo di minimizzare questi artefatti può essere l'accorciamento del TE al minimo possibile o mediante la messa a punto di sequenze di tipo T1 3D che rappresentano una possibile alternativa in termini di risoluzione e rapporto segnale/rumore dando luogo ad un contrasto T1 migliore che nelle immagini 2D, anche se di qualità non ottimale. Una migliore descrizione dell'anatomia in presenza di alta componente acquosa si ottiene mediante immagini pediatriche pesate in T2, con TR e TE più lunghi rispetto a quelli utilizzati nelle sequenze per adulti (fig. 1.7).

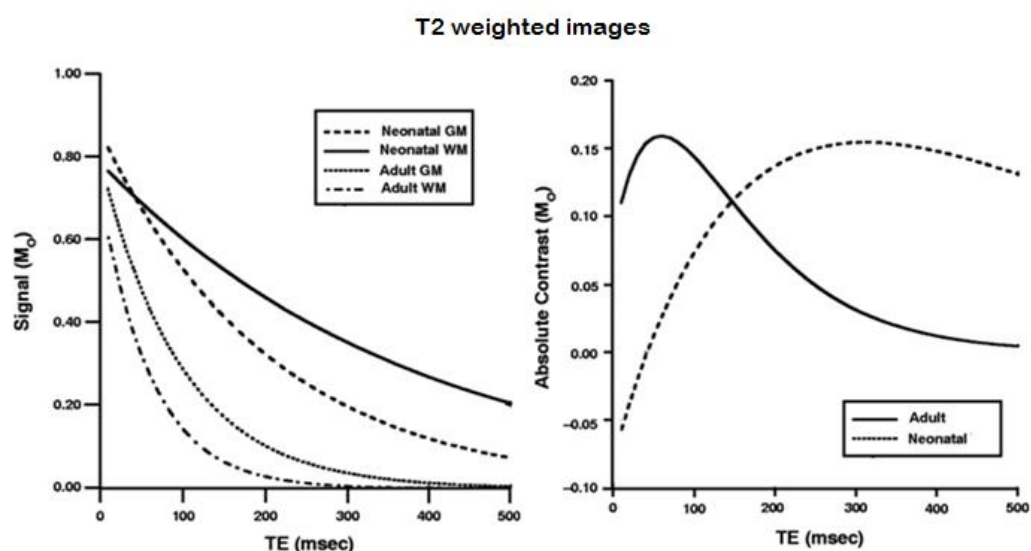


Figura 1.7. Andamento del segnale e del contrasto in una immagine pesata T2 (TR=4000ms). Nella immagine vengono confrontati i valori relativi aneonati ed adulti sia per la WM che la GM.[Jones, 2004]

Tenendo conto delle modifiche nella composizione dei tessuti nelle sei fasce di età, sono stati definiti i parametri ottimizzati per ogni sequenza (tabella 1.1).

0-3 mesi	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	6300	120	160x160	356x331	32	0.3x0.3x3	1.3	2	5.4	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	160x160	160x160	106	1x1x1	no	1	3.22	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	7207	75	200x200	144x140	58	1.4x1.4x2	2	2	8.02	32 dir (high), b=700
4-12 mesi	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	5020	100	190x190	424x409	40	0.3x0.3x3	1.3	2	5.31	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	190x190	192x160	132	1x1x1	no	1	4.13	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	10691	75	200x200	144x140	68	1.4x1.4x2	2	2	11.56	32 dir (high), b=1000
1-2 anni	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	5020	100	210x210	468x461	42	0.3x0.3x3	1.3	2	6.11	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	210x210	212x160	139	1x1x1	no	1	4.26	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	10859	80	220x220	156x156	71	1.4x1.4x2	2	2	12.07	32 dir (high), b=1000
2-3 anni	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	5020	100	220x220	488x486	45	0.3x0.3x3	1.3	2	6.31	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	220x220	220x160	149	1x1x1	no	1	4.47	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	10444	80	220x220	156x156	69	1.4x1.4x2.2	2	2	11.39	32 dir (high), b=1000

3-6 anni	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	4189	90	230x230	512x486	45	0.3x0.3x3	1.3	2	5.26	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	230x230	232x160	149	1x1x1	no	1	4.47	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	10841	80	240x240	172x168	67	1.4x1.4x2.3	2	2	12.06	32 dir (high), b=1000
6-17 anni	seq	TR	TE	FOV	matrix	fette	dim pixel	sense	NSA	min	opzioni specifiche
T2	ax 2D	3500	90	240x240	532x514	35	0.3x0.3x4	yes = 1.3	2	4.47	TSE=20
T1	ax 3D	9.4	4.6	240x240	240x160	154	1x1x1	n	1	4.56	TFE= 160, flip angle=8°
DTI	ax 2D	10047	85	240x240	172x168	68	1.4x1.4x2.3	yes=2	2	11.13	32 dir (high), b=1000

Tabella 1 1. In tabella vengono descritti tutti i parametri relativi alle sequenze del protocollo di acquisizione per i soggetti normali. Particolare importanza è svolta da FOV, numero di fette e dimensione del voxel, che deve rimanere sempre costante per ogni immagine appartenente ad un determinato range di età.

Per mantenere una equivalenza tra le sequenze sui diversi macchinari posseduti dalle diverse unità operative partecipanti al progetto, è stato deciso che i parametri geometrici forniti (FOV, slice thickness,...) debbano sempre essere rispettati e mantenuti fissi all'interno di ogni range. Nel nostro caso il FOV di T13D e T2 è stato progressivamente aumentato nei sei range a partire dal minore (0-3 mesi) di dimensioni 160x160x105 (APxLRxFH) fino al valore massimo (6-17 anni), simile a quello degli adulti, di dimensioni 240x240x154. Il FOV delle DTI è invece stato modificato progressivamente tra il valore 200x200x116 e 240x240x156, modificando le dimensioni in assiale (APxLR) in tre step e aumentando progressivamente il numero e lo spessore delle fette. Per la elaborazione e la visualizzazione delle immagini la dimensione del voxel è invece stata mantenuta costante in assiale, 0.45x0.45 mm per la T2, 1x1x1 per la T13D e 1.4x1.4 per la DTI. I parametri di acquisizione (TR e TE), studiati in maniera da ottimizzare il risultato e forniti come indicazione, possono invece essere modificati entro un range di accettabilità per venire incontro ad esigenze specifiche derivanti dal tipo di scanner utilizzato, nel limite di preservare però la qualità e le caratteristiche delle immagini acquisite. In particolare è stata definita una sequenza T13D che potesse ben adattarsi a tutti i range di età (con TR=9.3 ms e TE=4.6 ms) e delle sequenze T2, con parametri TR e TE molto lunghi per le acquisizioni neonatali (TR=6300, TE= 120), che sono stati diminuiti progressivamente fino a valori equivalenti alle sequenze per adulti (TR=3500, TE=90). Infine, per le acquisizioni DTI, è stata presa in considerazione una

sequenza a 32 direzioni. Benché non ottimizzata su tutti i range, è stata scelta questa sequenza in quanto non tutti i centri hanno la possibilità di modificare le direzioni dei gradienti del DTI. Di conseguenza, l'utilizzo della sequenza con il maggior numero di direzioni, la cui variabilità tra gli scanner è ridotta al minimo, ha fatto in modo che tutti i centri avessero a disposizione una sequenza con lo stesso numero di direzioni e con caratteristiche simili, tali da acquisire immagini il più possibile omogenee e comparabili, sebbene non ottimizzate per ogni caso. Particolare attenzione nelle sequenze DTI è stata posta sulla definizione del b-value. Generalmente del parametro b-value è definita in modo che: $(b \times \text{ADC}) \approx 1$. Ne consegue che se negli adulti il valore di b-value generalmente utilizzato è 1000 s/mm², nei neonati e nei bambini, dove la costante T2 e ADC sono generalmente più alti che negli adulti (con 25-40% di incremento), il b-value impiegato sia più corto: 600-700 s/mm².

1.3. Stato dell'arte sugli atlanti di normalità

Gli atlanti di normalità o template sono immagini anatomiche generate a partire da un campione di soggetti normali che vengono elaborati insieme per generare un'immagine finale rappresentante dell'anatomia media all'interno della popolazione utilizzata. Essi possono coprire un duplice obiettivo: in ambito clinico possono definire un riferimento utile per descrivere la normalità dell'encefalo, permettendo di definire la patologia come un discostamento significativo e non fisiologico da questa normalità. In ambito di ricerca, gli atlanti di normalità, sono di fondamentale importanza negli studi di gruppo, quando è necessario registrare e normalizzare le immagini dei singoli soggetti a dei riferimenti standard, in modo da renderle confrontabili. La possibilità di avere a disposizione degli atlanti diventa un punto critico negli studi pediatrici, poiché gli atlanti degli adulti non sono utilizzabili nei bambini a causa delle significative differenze tra i loro encefali. In entrambi gli ambiti, clinico e di ricerca, quindi l'esistenza di template ottimizzati per ogni età, durante il periodo di sviluppo è di estrema importanza.

Nel corso degli anni, diversi gruppi hanno lavorato per la creazione di atlanti pediatrici di normalità, ciascuno utilizzando criteri e metodi diversi.

Alcuni gruppi, per ottenere informazioni relative ad età specifiche hanno semplicemente implementato atlanti basati su un singolo soggetto dell'età di interesse.

Uno dei primi gruppi ad utilizzare un template specifico è stato quello di Dehaene [Dehaene-Lambertz, 2002] che ha generato un atlante per la normalizzazione di una immagine pesata in T2 di un soggetto di 3 mesi. Per la generazione dell'atlante sono stati incluse le immagini di altri due neonati della stessa età, il cui encefalo presentava forma simmetrica, che sono state allineate tra loro, mediate e sottoposte a smoothing.

Jelacic et al. [Jelacic et al.2006] hanno messo a disposizione in rete un database di immagini RM di bambini tra 0-4 anni d'età per permettere la consultazione di un cosiddetto atlante di soggetti normali. In questo lavoro, però i template non sono stati ottenuti tramite immagini medie, ma sono solo relative a singoli soggetti. Nel sito web descritto nel lavoro è possibile collegarsi ad una piattaforma in cui visualizzare immagini pesate in T1 e T2 di bambini normali per, eventualmente, confrontarle con immagini di soggetti patologici.

In un altro lavoro [Shan, 2006], è stato generato un atlante caratteristico dei 9 anni di età utilizzando la immagine T1 3D di una singola ragazzina sana riallineata al template pediatrico di 9 anni pubblicato dal Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Sul nuovo atlante, è inoltre stata effettuata una parcellizzazione dell'encefalo mediante la definizione di 25 regioni corrispondenti ad altrettante strutture cerebrali.

Questi esempi, benché permettano una buona descrizione dell'anatomia, possiedono il limite di essere strettamente dipendenti dai soggetti utilizzati. Nonostante i bambini siano catalogati come sani, non sono però in grado di descrivere appieno le caratteristiche della popolazione a cui appartengono, in quanto se si presuppone che essa sia normalmente distribuita, il singolo soggetto può non corrispondere alle caratteristiche medie e in ogni caso non sarà in grado di descrivere la variabilità fisiologica della condizione normale.

Per superare questo limite, è preferibile che la generazione di atlanti sia effettuata utilizzando un numero maggiore di soggetti, in modo da tenere conto della variabilità del gruppo e effettuare una descrizione più accurata e non dipendente da una singola anatomia. Per la creazione di atlanti di normalità le immagini di tutti i soggetti devono essere perfettamente registrate tra di loro per poter essere mediate per generare i template. A questo scopo diversi metodi di registrazione, normalizzazione e media possono essere utilizzati per permettere di ottimizzare il processing delle immagini.

Molti gruppi che negli ultimi anni si sono dedicati alla generazione di atlanti ha implementato dei metodi basati sulla creazione di un template iniziale che viene aggiornato iterativamente ad ogni step di analisi fino al raggiungimento della convergenza, ovvero al risultato ottimale che minimizzi le deformazioni finali da applicare ad ogni singolo soggetto per essere registrato al template. Normalmente questo processo necessita di un riferimento iniziale a cui tutti gli altri soggetti debbano essere co-registrati prima di procedere alla media per la creazione del primo template che verrà a sua volta utilizzato come riferimento per la registrazione delle immagini per lo step successivo. In alcuni casi come immagine di riferimento iniziale si utilizza un template preliminare generato coi propri dati co-registrati. Un esempio di tale utilizzo è fornito dagli atlanti ottenuti da scanner 1.5T e 3T generati con immagini T1 3D su una popolazione di sette neonati, nati a termine tra la 39 e la 42 settimana gestazionale [Kazemi, 2007]. In questo caso, l'atlante è stato generato effettuando una normalizzazione non lineare dei soggetti rispetto ad un template, calcolato come la

media delle immagini, che veniva iterativamente ricalcolato dopo ogni passaggio di normalizzazione. Un metodo simile, basato su un'ottimizzazione iterativa, è stato sfruttato anche su una popolazione di 36 bambini a 6 mesi di età per la creazione di un atlante specifico su immagini T1 [Akiyama, 2013]. In questo caso però la scelta del template di riferimento per la prima normalizzazione è ricaduta su un atlante già disponibile (NIHPD5–8m template [Fonov, 2011]) di età compatibile con quella del campione. Benché un metodo di tipo iterativo permetta di ottimizzare il template modificandolo ad ogni step dell'analisi e i metodi di registrazione sempre più raffinati siano in grado di minimizzare la dipendenza dal riferimento scelto per la prima registrazione, questo approccio introduce comunque un bias che influenza tutto il procedimento. Per questo motivo sono stati introdotti metodi più innovativi nel tentativo di eliminare questa dipendenza. Questo è l'esempio di un atlante di immagini T1 3D di una popolazione di bambini di 1 e 3 anni di età [Bhatia, 2007], generato tramite un metodo basato su expectation-maximization che utilizza l'integrazione di segmentazione e registrazione nel sistema di coordinate medio relativo alla popolazione. Un altro metodo, poi utilizzato in altri studi, è stato introdotto nella generazione di un atlante probabilistico su otto bambini di due anni di età [Joshi, 2004], tramite l'applicazione di una trasformazione media calcolata utilizzando metodi di registrazione non lineare diffeomorfica. In tutti questi casi, sono stati ottenuti risultati di buona qualità e sono stati presentati metodi innovativi che permettono la analisi di immagini in maniera molto accurata. Tuttavia, nonostante sia stato sorpassato il limite del singolo soggetto, il numero dei campioni rimane ugualmente basso e in grado di descrivere solamente un intervallo molto limitato.

Un progetto molto ampio e che ha permesso la creazione di atlanti utilizzando un alto numero di partecipanti, è relativo allo studio multicentrico svolto dall'NIH tra gli anni 2001 e 2007. Questo studio, benché relativo a sole apparecchiature di risonanza magnetica a 1.5 T, ha permesso di rendere disponibili, mediante un database, i dati pesati in T1, T2 e densità protonica (PD) relativi a soggetti normali di età compresa tra i 4.5 e i 17 anni. A completamento di questo studio è stato quasi parallelamente generato anche un altro database di immagini acquisite su macchinari a 1.5 Tesla, relative a bambini sani in età più giovane, compresa tra le due settimane di vita e i 4.5 anni. Tali immagini sono state utilizzate da alcuni gruppi per creare degli ulteriori atlanti e per sviluppare dei metodi che possono essere sfruttati su grandi campioni di dati. Tra questi,

relativamente al gruppo 4.5-17.5 anni, di particolare rilevanza è stata la implementazione di un toolbox per la creazione di atlanti con caratteristiche basate sulla popolazione di interesse, chiamato “Template O’ Matic” [Wilke, 2008]. Il toolbox utilizza un metodo statistico dinamico basato sulla segmentazione dei tessuti e sulla coregistrazione lineare degli scan dei singoli soggetti, che viene ricavata tramite una regressione sulle variabili indipendenti, come l’età e il genere. Utilizzando le variabili che descrivono il campione, i template derivati sono quindi appropriati dal punto di vista delle intensità dei valori di grigio. Questo metodo tuttavia, si basa unicamente su metodi di registrazione lineare e, di conseguenza, i dettagli anatomici di alcune zone, quali quelle corticali, possono risultare sfocati a causa dell’alta variabilità del segnale. Sulla stessa popolazione sono quindi stati generati dei template anatomici e mappe tissutali medie su 5 intervalli temporali (4.5-8.5, 7-11, 5-13, 10-14, 13-18 anni) relativi alle immagini T1, T2 e PD di 324 soggetti [Fonov, 2011] utilizzando una registrazione non lineare, basata su un metodo automatico di accoppiamento e catalogazione anatomica delle immagini (ANIMAL) [Collins, 1995]. Sanchez [Sanchez, 2012a; Sanchez, 2012b] ha creato invece dei template che descrivono lo sviluppo con un campionamento ogni 6 mesi di età sulla popolazione dei template NIH (sia dei più grandi, 4.5-17.5 anni, che su quella dei più piccoli, 2 settimane - 4.5 anni). Questi atlanti sono stati generati tramite il calcolo delle deformazioni affini e non lineari e mediante l’applicazione di una trasformazione media per ogni soggetto. Rispetto agli stessi template generati solo con registrazione lineare, questi ultimi sono caratterizzati oltre che da un dettaglio anatomico significativo anche da una specificità dipendente dall’età.

Negli ultimi anni l’impiego di macchinari ad alto campo, 3 Tesla, ha ottenuto un sempre maggiore consenso sia a scopo di ricerca che a scopo clinico e il loro utilizzo ha subito un incremento anche nella popolazione pediatrica. Alcuni gruppi di ricerca hanno focalizzato il loro lavoro alla creazione di atlanti su questo tipo di immagini, tuttavia ad oggi le risorse in rete relative a database di RM pediatriche normali o patologiche sono scarse, e non sono in grado di coprire tutto il range dello sviluppo pediatrico in pesature molteplici.

Un atlante pediatrico di età compresa tra i 9 e i 15 mesi è stato realizzato dal Cincinnati Children’s Hospital Medical Center ed è disponibile e usufruibile on line (<https://irc.cchmc.org/software/pedbrain.php>) ed off line [Altaye, 2008]. Si tratta di un atlante generato solamente con immagini pesate in T1 acquisite su un tomografo da 3

Tesla realizzato sulla base di 200 soggetti e non comprende quindi né multiple pesature né l'intero range di età di interesse. Sempre relativamente ad immagini acquisite su popolazioni neonatali mediante macchinari 3T, sono stati generati altri atlanti che includono immagini di diffusione o analisi di parcellizzazione cerebrale. Tra questi, template T1, T2 e DTI di una popolazione di 25 neonati, acquisiti entro i primi 4 giorni di vita, sono stati generati utilizzando un metodo iterativo di ottimizzazione del template, basato su registrazione non lineare diffeomorfica (<http://lbam.med.jhmi.edu/>). Questo è il primo esempio di analisi in cui vengono prese in considerazione sia immagini anatomiche T1 e T2 che immagini di DTI strutturale, tramite il calcolo di mappe di anisotropia (FA) e diffusività media (MD), effettuando anche una parcellizzazione dell'encefalo in 122 regioni [Oishi, 2011]. Infine, un atlante longitudinale relativo ai primi due anni dello sviluppo, 0-1-2 anni (<https://www.med.unc.edu/bric/ideagroup/free-softwares/unc-infant-0-1-2-atlases>), è stato generato a partire da immagini T1 e T2 [Shi, 2012]. In questo lavoro, un metodo integrato di segmentazione e registrazione ha permesso di ottenere le mappe tissutali, di calcolare gli atlanti T1, T2 e tissutali e di effettuare una parcellizzazione cerebrale in regioni di interesse.

Per evitare l'introduzione di ogni tipo di bias dovuto alla definizione di un riferimento iniziale, sono stati sviluppati alcuni metodi di registrazione [Seghers, 2004; Bathia, 2004 ; Rueckert 2006; Aljabar, 2008] che permettono di calcolare le trasformazioni medie per la registrazione dell'intero gruppo senza l'utilizzo di un singolo riferimento. Questi metodi, uniti all'utilizzo di trasformazioni affini e non lineari permette la generazione di atlanti di alta qualità. Un esempio di applicazione di tali metodi è stata la creazione atlanti longitudinali (<http://brain-development.org/brain-atlases/neonatal-brain-atlas/>) in una popolazione di 142 neonati tra la 28.6 e la 47.7 settimana gestazionale, che comprendono immagini pesate in T1 e T2 e le mappe tissutali, [Kuliskova-Murgasova, 2011]. La metodologia implementata, particolarmente innovativa, ha permesso di generare atlanti 4D in maniera dinamica suddividendo l'intero campione in sotto intervalli di età attraverso l'utilizzo di kernel gaussiani che, utilizzati come pesi nel calcolo della trasformazione affine media, hanno permesso di generare gruppi omogenei di dati. La ampiezza σ del kernel è stata definita a priori in base alle caratteristiche del dataset, in modo da ottenere un compromesso tra il numero di soggetti inclusi in ogni gruppo e la deviazione standard. Definita una distribuzione

del numero di soggetti acquisiti in ogni età t , l'ampiezza del kernel definisce la frequenza del campionamento dell'intero range. L'intera popolazione viene quindi suddivisa in sottogruppi all'interno dei quali viene calcolata la trasformazione affine media pesata. Il mantenimento di una ampiezza fissa permette quindi di prendere in considerazione gruppi di età omogenea, ma non permette di tener conto che una distribuzione non uniforme del numero di soggetti nel tempo comporta la creazione di atlanti disomogenei dal punto di vista del numero di soggetti mediati. Un metodo simile, ma ulteriormente ottimizzato, è stato utilizzato per la creazione di un altro template neonatale 4D (<http://brain-development.org/brain-atlases/consistent-high-definition-spatio-temporal-neonatal-brain-atlas/>), comprendente le pesature T1 e T2 e le rispettive mappe tissutali appartenenti a 204 soggetti di età compresa tra le 28 e le 44 settimane gestazionali [Serag, 2012]. Viene quindi introdotto, oltre al calcolo della trasformazione non lineare, anche l'utilizzo di kernel adattativi per la creazione degli atlanti dipendenti dall'età. L'impiego di kernel in grado di adattare il valore di σ a seconda della densità distribuzione ad ogni istante t permette infatti di variarne l'ampiezza in modo da correggere rispetto alla non omogeneità nel numero di soggetti all'interno della distribuzione relativa alle diverse età. Questo modello si basa sulla definizione di un σ iniziale, che ad ogni istante temporale può diminuire quando la densità di soggetti è maggiore e aumentare quando la densità di soggetti è minore, prendendo in considerazione un numero di soggetti uniforme. In caso di densità molto bassa ad una determinata settimana gestazionale t , però questo permetterebbe aumentare il valore di σ e di includere soggetti di età molto diversa, diminuendo la qualità della trasformazione stimata. Per questo motivo sono stati inseriti dei vincoli sull'ampiezza massima del kernel, legati alla dimensione dell'encefalo, in modo che la varianza dei soggetti inclusi nello stesso sottogruppo non sia elevata. In questo modo sono stati generati atlanti molto consistenti e con una ottima definizione anatomica che permette di descrivere i cambiamenti globali e locali all'interno della popolazione descritta.

Come mostrato, l'impiego di immagini acquisite ad alto campo, caratterizzate da maggiore segnale e miglior risoluzione, insieme alla possibilità di avere a disposizione immagini di diffusione molto dettagliate, ha portato alla implementazione di metodi sempre più innovativi e poliedrici, che permettono di generare atlanti che descrivono ogni sfaccettatura anatomica dell'encefalo. Tuttavia, al momento, non sono stati generati atlanti di normalità, che allo stesso tempo siano in grado di fornire

informazioni complete in diverse pesature, come T1, T2 e DTI, e di seguire le modificazioni anatomico-strutturali dell'encefalo in tutte le fasi dello sviluppo dalla nascita all'età adulta.

1.4 Il metodo implementato

Il metodo implementato in questo progetto per la creazione degli atlanti di normalità si basa su quanto precedentemente sviluppato dai gruppi di Kuliskova e Serag [Kuliskova-Murgasova, 2011; Serag 2012] che però si sono dedicati solo a soggetti neonati. In particolare questo metodo è stato sviluppato per essere utilizzato in ogni range d'età e pesatura di acquisizione (T1, T2, DTI), ottimizzando l'accuratezza della stima delle trasformazioni in base alle caratteristiche delle immagini, come la risoluzione e l'ampiezza delle fasce di età, che influisce su dimensioni e contrasto dell'immagine.

Il nostro metodo è basato su quattro step: registrazione rigida, registrazione affine, registrazione non lineare e media delle immagini con creazione del template (in figura 1.8 lo schema del metodo di elaborazione).

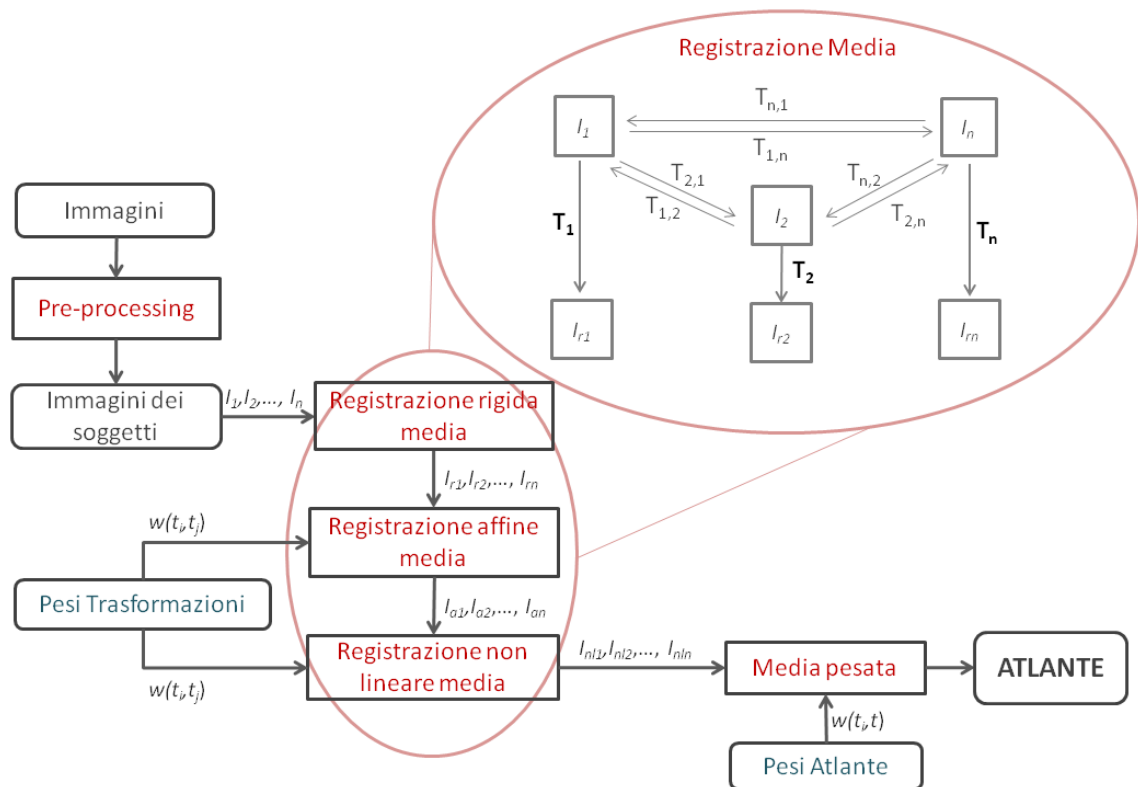


Figura 1.8. Schema a blocchi dell'analisi delle immagini per la generazione degli atlanti. Questo è stato applicato a tutte le pesature prese in considerazione (T1, T2, FA)

I primi due step (registrazione rigida e affine) sono stati utilizzati per coregistrare le diverse pesature fra loro in un singolo soggetto e per registrare le immagini di soggetti

diversi sia all'interno di una fascia di età che rispetto uno stesso spazio finale. La trasformazione non lineare, implementata tramite Free Form Deformations (FFD) [Rueckert, 1999] ha permesso di calcolare la deformazione generata in ogni punto dell'immagine.

Come vedremo in dettaglio più avanti, per generare l'atlante in uno spazio medio indipendente da un singolo riferimento, è stata stimata per ogni soggetto la media delle trasformazioni necessarie a normalizzare ogni soggetto a tutti gli altri. Tale trasformazione media è poi stata applicata all'immagine di partenza. Durante la creazione della trasformazione media, ad ogni componente è stato associato un peso che tenesse in considerazione la differenza di età tra i vari soggetti all'interno dei sei gruppi. Infine, un processo analogo è stato utilizzato per la creazione dei sei template, dove le immagini normalizzate sono state mediate utilizzando dei pesi che tenessero in considerazione la numerosità dei soggetti e la loro distanza dall'età media del range. Questo metodo ci ha permesso di generare degli atlanti ottimizzati per ogni range di età e pesatura che sono consistenti sia lungo l'intero range temporale 0-17 anni che tra le diverse modalità, in quanto normalizzati tramite parametri e pesi dipendenti dalle caratteristiche dei campioni, ma ad uno spazio comune indipendente.

Le elaborazioni delle immagini sono state effettuate, tramite l'utilizzo di toolbox implementati nei pacchetti FSL (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FSL>), Statistical Parametric Mapping (SPM, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>), Advanced Normalization Toolkit (ANTs, <http://stnava.github.io/ANTs/>) e Image Registration Toolkit (IRTK, <https://www.doc.ic.ac.uk/~dr/software/>), che permettono di effettuare pre-processing e registrazione delle immagini applicando metodologie differenti.

1.4.1. Pre processing delle immagini

Le immagini dei soggetti sani inseriti nel database Colibrì sono state esportate, catalogate e suddivise nelle varie fasce di età e nelle varie pesature.

Lo stadio di pre-processing, per ogni fascia di età e pesatura è stato caratterizzato da: estrazione del tessuto cerebrale, riorientamento delle immagine e reset dell'origine. L'estrazione del tessuto cerebrale, eseguito tramite il software BET (Brain Extraction Tool) incluso in FSL [Smith, 2002], consiste nella pulizia delle immagini di risonanza

da tutti i tessuti che non fanno parte dell'encefalo, quali pelle, osso, cartilagini e bulbi oculari. Questo processo si basa parallelamente sullo studio dell'istogramma dell'immagine e sulla propagazione di una mesh di superficie. L'istogramma permette di definire il valore di intensità corrispondente alla soglia di separazione encefalo/non encefalo e ad identificare i bordi dei tessuti cerebrali. Quest'ultimo valore di soglia fornisce un limite di espansione della mesh, che partendo dall'interno dell'encefalo è in grado di deformarsi fino al raggiungimento del bordo corticale e definisce una maschera binaria che include solo i tessuti cerebrali. Questo procedimento viene normalmente effettuato per eliminare dall'immagine tutte le componenti extra cerebrali, non utili al fine dello studio dell'encefalo e che potrebbero causare degli errori nella normalizzazione delle immagini.

Il riorientamento e il riposizionamento dell'origine vengono fatti invece in modo che negli step di registrazione le immagini partano tutte da una configurazione simile. Tutte le immagini vengono quindi riorientate perché siano allineate rispetto agli assi del campo di vista dell'immagine e simmetriche rispetto all'asse che passa per la linea mediana sia in posizione assiale che coronale. Il riallineamento sagittale viene effettuato posizionando l'immagine in modo che la linea che unisce la commissura anteriore e posteriore (linea AC-PC) sia parallela all'asse. Infine l'origine viene fissata convenzionalmente nella commissura anteriore. Entrambi i passaggi sono effettuati manualmente tramite SPM12.

A questo punto il pre-processing viene ottimizzato a seconda della pesatura delle immagini.

Rescaling

Immagini acquisite su diversi soggetti della stessa età, ma su scanner differenti, è possibile che siano caratterizzate da istogrammi, intensità e contrasti molto differenti. Infatti, nonostante le immagini siano codificate in 32 bit i livelli di grigio dell'immagine possono occupare solo una porzione della scala disponibile con quella codifica. Quando questo accade, perché le immagini siano confrontabili, una volta determinato quale soggetto abbia una acquisizione di qualità migliore, le intensità degli altri verranno riscalate sullo stesso range di valori di grigio attraverso un aggiustamento dell'istogramma (figura 1.9). Questo procedimento è stato effettuato mediante il software *irtk*.

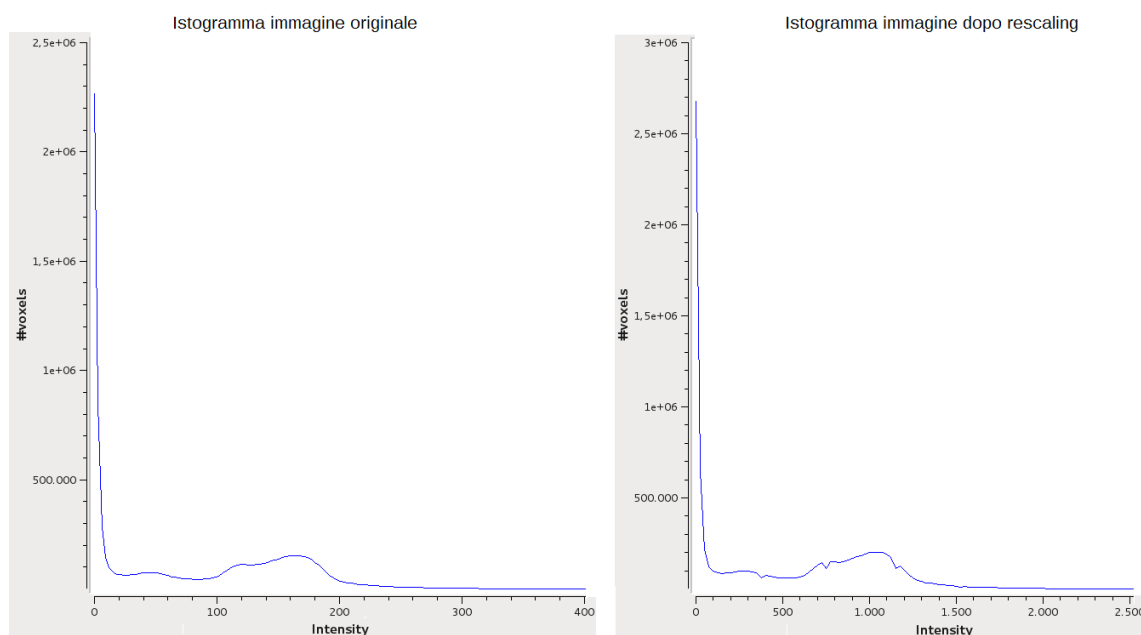


Figura 1.9. Comparazione degli istogrammi di una immagine prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'operazione di rescaling dei livelli di grigio. Dopo il rescaling l'istogramma dell'immagine è traslato sulla stessa scala di valori delle altre immagini e permetterà la visualizzazione utilizzando lo stesso contrasto.

Reslicing

Mentre le immagini T1 sono volumetriche e possiedono una buona risoluzione in tutte e tre le proiezioni, le immagini T2, acquisite ad alta risoluzione sul piano assiale, hanno uno spessore delle fette molto maggiore, caratteristica che non permette di risolverle in modo adeguato in coronale e sagittale. Al fine di recuperare risoluzione in queste due viste e migliorare il risultato delle registrazioni, soprattutto nei range di età dove la variabilità del campione è maggiore, le immagini T2 sono state sottoposte ad un reslicing per diminuire lo spessore delle fette pur mantenendo la risoluzione nel piano assiale. Le immagini dei gruppi 4-12 mesi, 1-2 anni e 3-6 anni sono state ricampionate ed interpolate ad uno spessore di 1 mm, mentre il gruppo 6-17 anni, è stato ricampionato ad uno spessore di 1.5 mm (figura 1.10).

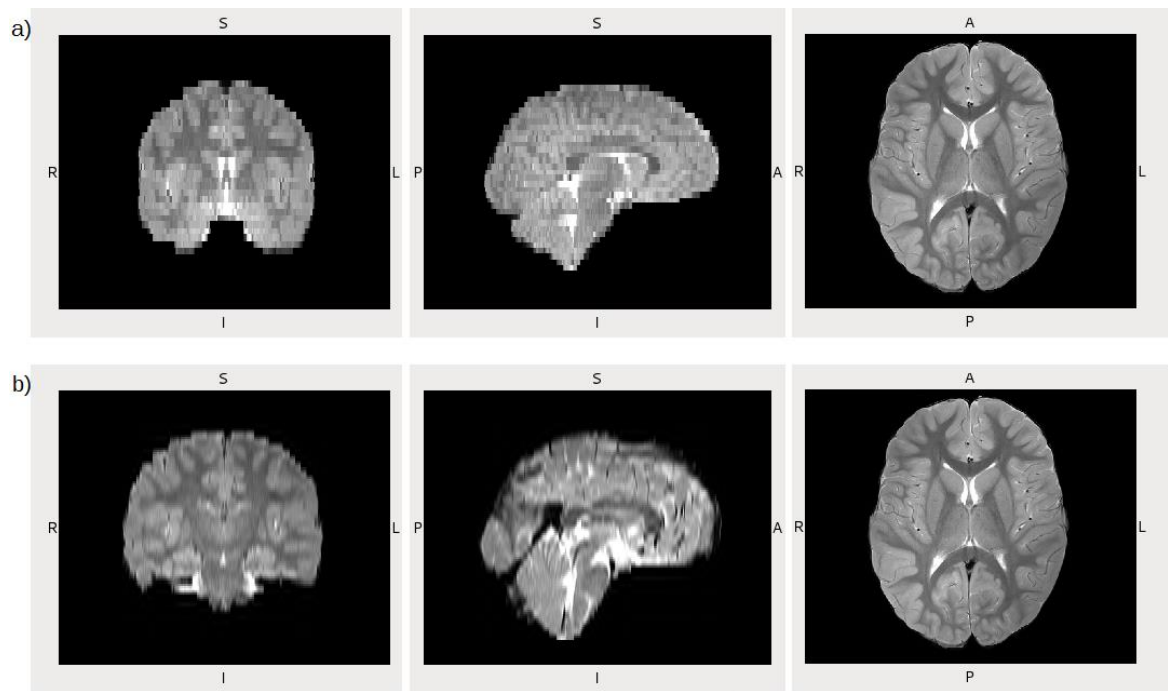


Figura 1.10. In figura vengono mostrate l'immagine prima del reslicing (a) e dopo (b). Nelle sezioni coronali e sagittali si nota un effetto di smoothing introdotto dall'interpolazione, ma un miglioramento della risoluzione.

Correzione delle disomogeneità

Poiché le immagini risultano particolarmente sensibili al campo magnetico, l'algoritmo N4 di correzione delle non-uniformità di intensità (ANTs) [Tustison, 2010] è stato utilizzato per correggere le disomogeneità di campo, che introducono delle modifiche nell'intensità del segnale nelle immagini. Tale algoritmo schematizza il campo tramite un modello parametrico gaussiano e durante il processo di correzione utilizza funzioni B-spline per effettuare un migliore adattamento del modello e consentire la stima su risoluzioni multiple.

Preprocessing delle immagini DTI

Il preprocessing delle immagini DTI ha previsto alcuni passaggi specifici, in particolare la correzione delle correnti indotte, la ricostruzione del tensore e la ricostruzione delle mappe tensoriali parametriche. Questi passaggi sono stati effettuati con il toolbox FDT per l'analisi delle immagini di diffusione, incluso nel software FSL. Le correnti indotte dai gradienti di diffusione generano delle distorsioni e disallineamenti che possono essere molto ingenti nelle immagini di DTI. L'algoritmo permette di calcolare e

correggere le distorsioni di traslazione, taglio e scala indotte dai gradienti sulle immagini, utilizzando come riferimento l'immagine B_0 dell'acquisizione DTI, ottenuta in assenza di gradienti di diffusione. Infine, a partire dai dati, dalle direzioni dei gradienti e dai valori di b per ogni gradiente, è stato possibile ricostruire il tensore e alcune mappe tensoriali. Tra queste, di particolare interesse sono la direzione prevalente di diffusione in ogni voxel (determinata dal primo autovettore, $V1$), la diffusione media nel tessuto (MD) e la Fractional Anisotropy (FA), calcolate come:

$$MD = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3 \quad (2)$$

$$FA = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad (3)$$

dove $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ sono i tre auto valori del tensore. Infine le mappe parametriche, contenenti i valori dell'indice, sono state convertite in immagini nifti che potessero essere lette dal nostro software di registrazione.

1.4.2. La registrazione

La registrazione è un processo il cui obiettivo è rendere sovrapponibili due immagini inizialmente differenti. A questo scopo una immagine viene definita come riferimento, mentre l'altra immagine viene trasformata nello spazio in modo da sovrapporsi al riferimento.

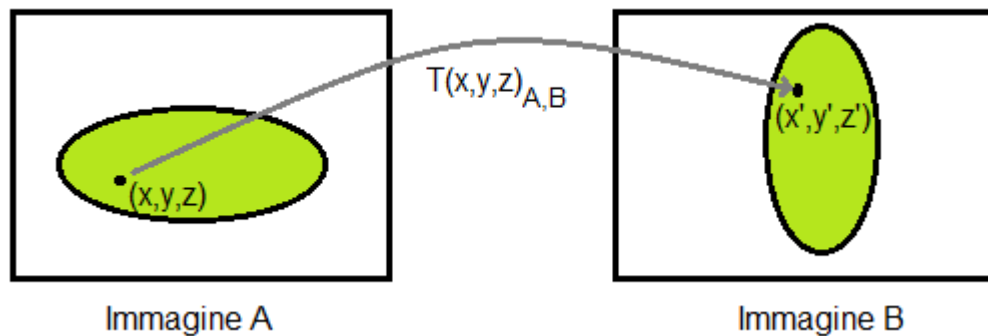


Figura 1.11. Schema del processo di registrazione di una immagine

Per fare questo, per ogni voxel dell'immagine di riferimento è necessario definire una corrispondenza nell'immagine da registrare e determinare lo spostamento, ovvero la trasformazione, che deve essere applicata per far coincidere le due posizioni (figura 1.11).

Registrazione rigida

Nella trasformazione rigida le immagini vengono riallineate senza modificarne le caratteristiche, in termini di distanza tra i punti, forma e scala, per far coincidere all'interno dello spazio due immagini con origini e direzioni differenti. In questo processo la trasformazione spaziale viene stimata prendendo in considerazione unicamente le componenti di traslazione e di rotazione attorno a 3 assi x,y,z senza modifica in alcun modo le distanza fra i due punti dell'immagine registrata.

Abbiamo quindi sei parametri che sono in grado di generare la matrice di trasformazione che può esser riassunta attraverso il sistema di matrici seguenti. Per la traslazione:

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & x_0 \\ 0 & 1 & 0 & y_0 \\ 0 & 0 & 1 & z_0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (4)$$

dove x_0, y_0, z_0 descrivono le traslazioni lungo i tre assi. Le rotazioni sono invece definite tramite una composizione di funzioni sen e cos dei parametri α, β e γ che descrivono gli angoli di rotazione intorno ai tre assi:

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ 0 & -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} \cos \beta & 0 & \sin \beta & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\sin \beta & 0 & \cos \beta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} \cos \gamma & \sin \gamma & 0 & 0 \\ -\sin \gamma & \cos \gamma & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (5)$$

La trasformazione rigida è stata calcolata tramite un metodo basato sulla Mutua Informazione Normalizzata (NMI) [Maes, 1997], che definisce la mutua dipendenza tra le due immagini a partire dai loro livelli di grigio. L'indice NMI è strettamente legato al concetto di Entropia dell'immagine, che è in grado di definire l'informazione contenuta nell'immagine in base alla probabilità che il segnale contenuto in ogni voxel dell'immagine abbia un determinato valore di grigio. Il risultato finale della

registrazione viene definito da quei parametri che sono in grado di massimizzare l'indice NMI tra le due immagini e minimizzare la loro entropia:

$$I(A, B) = \frac{H(A) + H(B)}{H(A, B)} \quad (6)$$

dove $H(A)$ e $H(B)$ corrispondono rispettivamente all'entropia delle immagini A e B e $H(A, B)$ al valore della loro entropia congiunta.

I parametri di traslazione e rotazione sono stati definiti attraverso un algoritmo basato su tre livelli di risoluzione spaziale. In questo processo è possibile definire la risoluzione iniziale, che viene raddoppiata ad ogni livello. Attraverso i vari passaggi di risoluzione i parametri vengono aggiornati attraverso un processo iterativo, fino alla convergenza dei parametri ottimali.

Il processo di registrazione rigida è stato utilizzato come primo step di registrazione su tutte le immagini, utilizzando lo stesso algoritmo e gli stessi parametri di settaggio, per tutte gli intervalli di età e tutte le pesature ottenendo ottimi risultati.

Registrazione affine

La registrazione affine introduce un livello di complessità nella trasformazione delle immagini. A differenza della trasformazione rigida che applica solamente delle traslazioni e rotazioni delle immagini, la trasformazione affine introduce nuovi gradi di libertà. Durante questo processo le immagini vengono riallineate tramite deformazioni generali in grado di attenuare le diversità di forma e dimensione degli encefali, preservando il parallelismo delle linee, ma modificando la loro lunghezza e gli angoli che le linee definiscono. Tali deformazioni possono essere ricondotte a due categorie: la prima introduce tre nuovi parametri che descrivono i fattori di scala lungo le tre dimensioni, detti scaling; la seconda definisce tre ulteriori parametri che descrivono le deformazioni di taglio nelle tre direzioni, dette shears. A seconda delle caratteristiche delle immagini analizzate si può quindi definire una trasformazione affine a 9 parametri che tenga in considerazione solo gli effetti di scaling (k), oppure una deformazione a 12 parametri che prenda in considerazione sia lo scaling che le shears (s):

$$\begin{pmatrix} k_x & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_y & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_z & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 1 & s_1 & s_2 & 0 \\ 0 & 1 & s_3 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (7)$$

Nel nostro caso, la scelta di utilizzo tra una trasformazione affine a 9 o 12 parametri è stata effettuata in base alle caratteristiche delle immagini e alla variabilità attesa all'interno di ogni gruppo di età. Infatti, nei gruppi dove era attesa una variabilità minore in termini di forma e dimensione (range di età: 2-3 anni, 3-6 anni, 6-17 anni) è stata effettuata una trasformazione a 9 parametri che fosse in grado di correggere minime deformazioni compensando il diverso posizionamento all'interno dei voxel dell'immagine. Nei gruppi dei soggetti più giovani (age range: 0-3 mesi, 4-12 mesi 1-2 anni), dove era attesa una variabilità più ampia in termini di dimensioni, forma e definizione delle strutture cerebrali è stata applicata una trasformazione affine a 12 parametri così che fosse possibile effettuare una trasformazione più accurata.

Come avvenuto per la trasformazione rigida anche per la trasformazione affine i parametri di scaling e shear sono stati definiti attraverso un algoritmo basato su massimizzazione NMI ed effettuata su tre livelli di risoluzione spaziale in cui, passando dalla risoluzione più bassa a quella più elevata, vengono aggiornati attraverso un processo iterativo, fino alla convergenza dei parametri ottimali.

Registrazione non lineare

L'ultimo passaggio di registrazione delle immagini, che definisce il risultato finale dell'intero processo di registrazione, è il calcolo delle deformazioni non lineari.

Esistono molti metodi che permettono di effettuare una registrazione non lineare di immagini, tuttavia la maggior parte di essi sono focalizzati sulla normalizzazione specifica di immagini mono-modali. Per la creazione degli atlanti è stato necessario utilizzare un metodo che permettesse l'utilizzo su un ampio range di deformazioni anche in ambito multimodale. Il metodo scelto è basato sulla Free-Form Deformation (FFD) [Rueckert, 1999] inizialmente introdotto per la registrazione di immagini RM pre e post iniezione del mezzo di contrasto e poi ottimizzate per un utilizzo più generico, comprendente immagini multimodali e multidistrettuali [Schanbel, 2001; Seghers, 2004]. Grazie alle caratteristiche adattative del modello, questo metodo risulta

particolarmente conveniente per l'utilizzo con immagini cerebrali e nel nostro caso specifico per la creazione di atlanti di normalità su un range di età molto ampio e caratterizzato da ampia variabilità e differenti pesature di immagini.

La registrazione basata su Free-Form Deformation (FFD) permette di stimare le trasformazioni locali dell'immagine che non sono state stimate attraverso la registrazione rigida e affine. Le deformazioni locali possono modificarsi in maniera significativa a seconda del range di età e l'utilizzo di trasformazioni basate su B-spline permette di descrivere tali deformazioni in maniera molto accurata in tutte le dimensioni dell'immagine. L'idea di base su cui si fonda il metodo FFD è di trasformare l'immagine tramite la deformazione di una mesh di controllo. L'immagine infatti può essere campionata attraverso una griglia con spaziatura più o meno fitta che ne definisce la risoluzione e la registrazione viene descritta come la deformazione di ogni nodo della griglia rispetto al target. Nella FFD basata su B-spline, dato il dominio del volume dell'immagine $\Omega\{(x, y, z) \mid 0 \leq x \leq X, 0 \leq y \leq Y, 0 \leq z \leq Z\}$ con ϕ che descrive la mesh di controllo di dimensioni $n_x \times n_y \times n_z$ con spaziatura δ , dove ogni nodo è definito da $\phi_{i,j,k}$. La FFD può essere descritta come il prodotto del tensore delle B-spline:

$$T_{local}(x, y, z) = \sum_{l=0}^3 \sum_{m=0}^3 \sum_{n=0}^3 B_l(u) B_m(v) B_n(w) \phi_{i+l, j+m, k+n} \quad (8)$$

Dove $i = \lfloor x/n_x \rfloor - 1, j = \lfloor y/n_y \rfloor - 1, k = \lfloor z/n_z \rfloor - 1,$

$$u = x/n_x - \lfloor x/n_x \rfloor, v = y/n_y - \lfloor y/n_y \rfloor, w = z/n_z - \lfloor z/n_z \rfloor$$

e dove B_l rappresenta la l -esima funzione della B-spline:

$$B_0(u) = (1-u)^3/6$$

$$B_1(u) = (3u^3 - 6u^2 + 4)/6$$

$$B_2(u) = (-3u^3 + 3u^2 + 3u + 1)/6$$

$$B_3(u) = u^3/6$$

Le B-spline sono controllate localmente, rendendole efficienti dal punto di vista computazionale anche per un alto numero di punti di controllo. I punti di controllo ϕ agiscono come parametri nella deformazione non rigida, la cui deformazione dipende dalla risoluzione della mesh, quindi dalla spaziatura δ . Un alto δ permette di modellare

le deformazioni non rigide globali, mentre un basso valore di δ permette di modellare le deformazioni molto locali. Allo stesso tempo il parametro δ definisce oltre che la risoluzione della mesh anche il numero di gradi di libertà del modello e di conseguenza, la complessità computazionale. Un compromesso tra la risoluzione e la complessità computazionale deve quindi essere definito in base alle caratteristiche delle immagini da analizzare. Per raggiungere il miglior compromesso è stato introdotto un approccio a multi-risoluzione [Lee, 1997], dove viene definito un numero di livelli di risoluzione L , all'interno dei quali la risoluzione della mesh di controllo è incrementata fino ad un valore massimo di risoluzione (figura 1.12).

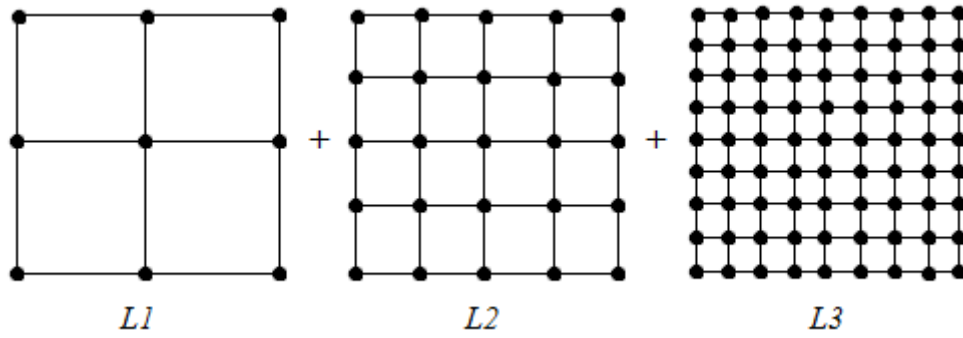


Figura 1.12. Schema dell'incremento della risoluzione della mesh di controllo nei tre livelli $L1$, $L2$, $L3$.

La deformazione viene calcolata per ogni punto della mesh ad ogni livello e la deformazione locale per ogni punto dell'immagine viene calcolata come la somma delle deformazioni tra i livelli:

$$T_{local}(x, y, z) = \sum_{h=1}^H T_{local}^h(x, y, z) \quad (9)$$

Per vincolare la trasformazione FFD in modo da massimizzare la sua smoothness, è stata introdotta una funzione di costo della deformazione che corrisponde alla versione 3D del calcolo dell'energia interna di piegamento della spline, che ne limita l'allungamento e il piegamento. Questo termine può essere definito come:

$$C_{smooth} = \frac{1}{V} \int_0^X \int_0^Y \int_0^Z \left[\left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right)^2 + \left(\frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right)^2 + \left(\frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right)^2 + 2 \left(\frac{\partial^2 T}{\partial xy} \right)^2 + 2 \left(\frac{\partial^2 T}{\partial xz} \right)^2 + 2 \left(\frac{\partial^2 T}{\partial yz} \right)^2 \right] dx dy dz \quad (10)$$

Un secondo termine di costo relativo alla similarità delle immagini è definito dalla NMI tra le immagini da registrare:

$$C_{similarity} = \frac{H(A) + H(B)}{H(A, B)} \quad (11)$$

La trasformazione ottimale è ottenuta come quella che minimizza la funzione di costo associata con entrambi i parametri di trasformazione globale (θ) e locale (ϕ):

$$C(\theta, \phi) = -C_{similarity}(I(t_0), T(I(t))) + \lambda C_{smooth}(T) \quad (12)$$

dove λ è il parametro che definisce il compromesso tra l'allineamento dei volumi delle due immagini la smoothness della trasformazione.

Per la creazione dei nostri template abbiamo quindi deciso di ottimizzare i parametri di registrazione sui quali fosse possibile influire: λ e spaziatura δ . Questi parametri sono stati adattati in base alle deformazioni attese e alle dimensioni dei voxel delle immagini. Il nostro obiettivo per la creazione dei template su immagini appartenenti a soggetti diversi è quello di normalizzare le immagini tra loro senza stravolgere completamente l'anatomia iniziale del singolo soggetto. Il primo parametro su cui è stato possibile influire è il parametro λ . Il suo valore può variare da un minimo di 0, dove vi è massima limitazione della deformazione locale ad un massimo di 1, dove la limitazione è minima. Inizialmente è stato pensato di mantenere una limitazione abbastanza bassa quando le deformazioni locali stimate erano relativamente alte (ex. Age range 0-3 mesi, 4-12 mesi, 1-2 anni), tuttavia all'atto pratico tale valore introduceva deformazioni troppo alte che durante la creazione dei template in presenza di un basso numero di soggetti producono un effetto di rumore, abbassando la qualità del risultato di registrazione. Dopo alcune prove empiriche è stato deciso di adottare un valore di λ pari a 0.001, adottato anche dagli altri gruppi che utilizzano lo stesso metodo non lineare, e di mantenerlo fisso per tutti i range di età e tutte le pesature di immagine. Il secondo parametro su cui era possibile effettuare una ottimizzazione è la spaziatura della griglia in tutte le direzioni, il cui valore permette di calcolare deformazioni più o meno ampie. Sapendo che il metodo dimezza la spaziatura ad ogni livello ed avendo fissato a 3 il numero di livelli, i valori sono stati calcolati a partire dalla dimensione dei voxel dell'immagine e in base alla

deformazione locale attesa nelle varie fasce di età. Particolare attenzione è stata dedicata alla scelta dei valori di spaziatura delle immagini pesante in T2, a causa della forte differenza di risoluzione iniziale nelle tre dimensioni e al particolare preprocessing effettuato. In questo caso i valori sono stati pensati anche al fine di minimizzare gli effetti introdotti dal reslicing e di massimizzare il recupero di risoluzione in orientamento coronale e sagittale. I valori sono riassunti in tabella 1.2.

<i>Gruppo</i>	<i>Immagine</i>	<i># Sogg</i>	<i>Dim Voxel</i>	<i>Reslicing</i>	<i>Par Affine</i>	λ	δ
0-3 mesi	T1 3D	1	1 x 1 x 1	-	12	0.001	20 20 20
	T2	1	0.45 x 0.45 x 3	0.3 x 0.3 x 1	12	0.001	5 5 10
	DTI	1	1.4 x 1.4 x 2	-	12	0.001	20 20 20
4-12 mesi	T1 3D	6	1 x 1 x 1	-	12	0.001	20 20 20
	T2	6	0.3 x 0.3 x 3	0.3 x 0.3 x 1	12	0.001	5 5 10
	DTI	6	1.4 x 1.4 x 2	-	12	0.001	20 20 20
1-2 anni	T1 3D	6	1 x 1 x 1	-	12	0.001	20 20 20
	T2	6	0.3 x 0.3 x 3	0.3 x 0.3 x 1	12	0.001	5 5 10
	DTI	6	1.4 x 1.4 x 2	-	12	0.001	20 20 20
2-3 anni	T1 3D	0	1 x 1 x 1	-	9	0.001	20 20 20
	T2	0	0.3 x 0.3 x 3	0.3 x 0.3 x 1	9	0.001	5 5 10
	DTI	0	1.4 x 1.4 x 2.2	-	9	0.001	20 20 20
3-6 anni	T1 3D	7	1 x 1 x 1	-	9	0.001	20 20 20
	T2	7	0.3 x 0.3 x 3	0.3 x 0.3 x 1	9	0.001	5 5 10
	DTI	7	1.4 x 1.4 x 2.3	-	9	0.001	20 20 20
6-17 anni	T1 3D	16	1 x 1 x 1	-	9	0.001	20 20 20
	T2	16	0.3 x 0.3 x 4	0.3 x 0.3 x 1.5	9	0.001	8 8 10
	DTI	15	1.4 x 1.4 x 2.3	-	9	0.001	20 20 20

Tabella 1.2. Riassunto parametri per registrazione

1.4.3. Le trasformazioni medie e i pesi

La scelta del soggetto di riferimento, necessaria per ogni passo relativo alle trasformazioni descritte nelle sezioni precedenti introduce di fatto un bias. In effetti la scelta di un soggetto o di un altro può determinare la qualità dei risultati della registrazione. Per eliminare questo bias si è deciso di associare ad ogni soggetto la trasformazione media come descritto anche in alcuni lavori [Kuliskova-Murgasova, 2011; Serag 2012]. All'interno di ogni range d'età e pesatura, per ciascun soggetto è stata calcolata la trasformazione rispetto a tutti gli altri ed è stata poi calcolata la trasformazione media (fig. 1. 13).

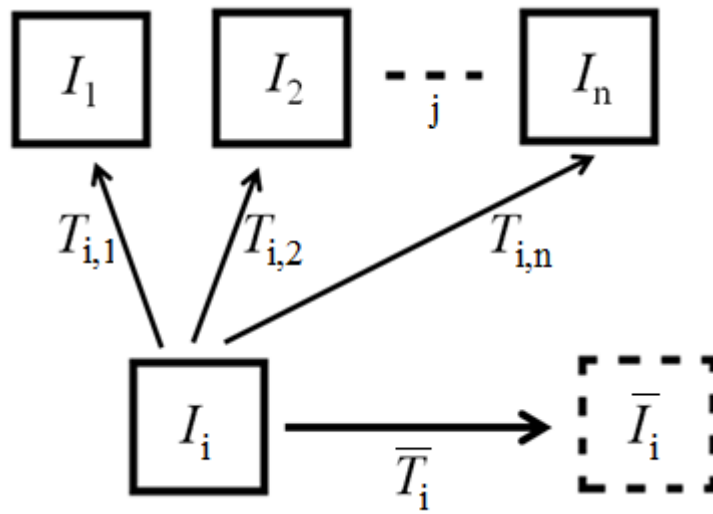


Figura 2.13. Schema trasformazione media

Se n è il numero delle immagini di un gruppo di soggetti e $T_{i,j}$ è la trasformazione applicata ad i per essere trasformata nello spazio di j , la trasformazione media di i può essere calcolata come:

$$\bar{T}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n T_{i,j} \quad (13)$$

L'applicazione di questa trasformazione media all'immagine di partenza I_i , permette di registrare la immagine, non allo spazio di un singolo riferimento, ma ad uno spazio di coordinate comune, ottenendo:

$$\bar{I}_i = I_i \circ \bar{T}_i^{-1} \quad (14)$$

Questa tecnica permette di generare un gruppo di immagini $\bar{T}_i$ ricondotte ad uno stesso spazio comune mediante registrazione.

In particolare, il calcolo di questa trasformazione media può essere impiegato all'interno di ogni range d'età e pesatura RM. La registrazione rigida delle immagini di tutti i soggetti al medesimo spazio di riferimento, tramite l'impiego di una trasformazione media, permette di minimizzare le deformazioni non lineari applicate negli step di analisi successivi. Questo risulta di particolare utilità in un campione caratterizzato a bassa numerosità e/o alta variabilità, in cui l'applicazione di deformazioni elevate introduce una criticità aumentando il rischio di deformazioni non fisiologiche.

Per il calcolo delle trasformazioni medie, si è ritenuto inoltre utile l'utilizzo di kernel gaussiani che definiscono i pesi da associare alla trasformazione con l'obiettivo di mediare le differenze inter-soggetto in particolare per le trasformazioni affini e non lineari dove vengono introdotte delle deformazioni. Come già descritto nella sezione 1.2.2, per la creazione del database e degli atlanti di normalità, l'intero range temporale pediatrico (0-17anni) è stato suddiviso in sei sotto intervalli, di cui si conoscono i limiti temporali, ma la cui numerosità non è fissa né conosciuta a priori e dipende dal numero di acquisizioni effettuate fino a quel momento. È necessario quindi implementare un metodo che all'interno di ogni range di età, sia in grado di adattarsi alle caratteristiche dei soggetti e alla numerosità del campione. In questo ambito, Kuliskova e Serag [Kuliskova-Murgasova, 2011; Serag 2012] hanno utilizzato il kernel per campionare il loro range di soggetti in un numero maggiore di sotto-intervalli in modo da mantenere la numerosità e l'omogeneità della popolazione per ogni atlante calcolato.

Nel nostro lavoro, invece, abbiamo deciso di utilizzare dei kernel gaussiani simili a quelli da loro presentati, ma con il fine di ottimizzare la trasformazione media, sulla base della numerosità e scostamento dalla media dell'età dei nostri soggetti all'interno di ogni fascia definita in precedenza.

All'interno di un range di età popolato da n soggetti, calcolando la trasformazione $T_{i,j}$ del singolo soggetto i sul soggetto j si definisce un peso tramite un kernel Gaussiano:

$$w(t_i, t_j) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\frac{-(t_j - t_i)^2}{2\sigma^2}} \quad (15)$$

dove la ampiezza σ è stata calcolata come la deviazione standard dell'età degli n soggetti che compongono il gruppo e varia in funzione di essi. Il peso w è stato quindi calcolato prendendo questo valore di σ , come valore t_i l'età del soggetto per cui si sta calcolando la trasformazione e t_j l'età del soggetto che nella singola trasformazione definisce il riferimento.

La trasformazione media pesata per ogni soggetto i , può essere definita come segue:

$$\bar{T}_i = \frac{\sum_{j=1}^n w(t_i, t_j) T_{i,j}}{\sum_{j=1}^n w(t_i, t_j)}. \quad (16)$$

In questo modo per ogni soggetto la trasformazione media viene calcolata tenendo conto di tutti i soggetti contenuti nel range, ma fornendo un peso più alto ai soggetti di età più vicina a quello in oggetto, la cui deformazione media è supposta essere minore, e un peso più basso ai soggetti che si discostano molto in età e quindi in deformazione attesa.

1.4.4. Creazione degli atlanti

Una volta terminato il processo di deformazione non lineare delle immagini queste sono state sottoposte ad un processo di media per la creazione dell'atlante. Il template viene creato usando tutti i soggetti all'interno di ogni range in modo da descrivere l'anatomia media del gruppo. Tuttavia, trattandosi di intervalli temporali talvolta abbastanza estesi, la generazione dell'atlante deve essere effettuata tenendo come riferimento l'età media del range, indipendentemente dai soggetti che lo compongono. In modo da mantenere una accuratezza ottimale della stima anche per questa media sono stati utilizzati dei kernel gaussiani. Per ogni soggetto i il peso può essere descritto come:

$$w(t_i, t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\frac{-(t_i - t)^2}{2\sigma^2}} \quad (17)$$

dove σ è definito dalla deviazione standard dell'età dei soggetti inclusi nell'intervallo, t_i è l'età del singolo soggetto e il valore di t viene calcolato come l'età media attesa del range (cioè a metà del range). L'atlante viene quindi calcolato tramite la media pesata:

$$Atlas(t) = \frac{\sum_{i=1}^n w(t_i, t) \bar{I}_i}{\sum_{i=1}^n w(t_i, t)} \quad (18)$$

In questo modo nella creazione dell'atlante viene fornito un peso maggiore ai soggetti più vicini all'età media del range e che meglio lo rappresentano e un peso minore ai soggetti più vicini agli estremi.

1.5 Risultati

Gli atlanti T1

Atlanti T1, età 4-12 mesi

In figura 1.14 si mostra l'atlante T1 nel gruppo di bambini 4-12 mesi. Il template è stato calcolato su 5 soggetti, di età mediana 10 mesi, media 9 mesi e una deviazione standard di 3.5 mesi. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono stati 15 secondi per ogni trasformazione rigida, 30 secondi per ogni trasformazione affine e 11 minuti e 40 secondi per ogni trasformazione non lineare.

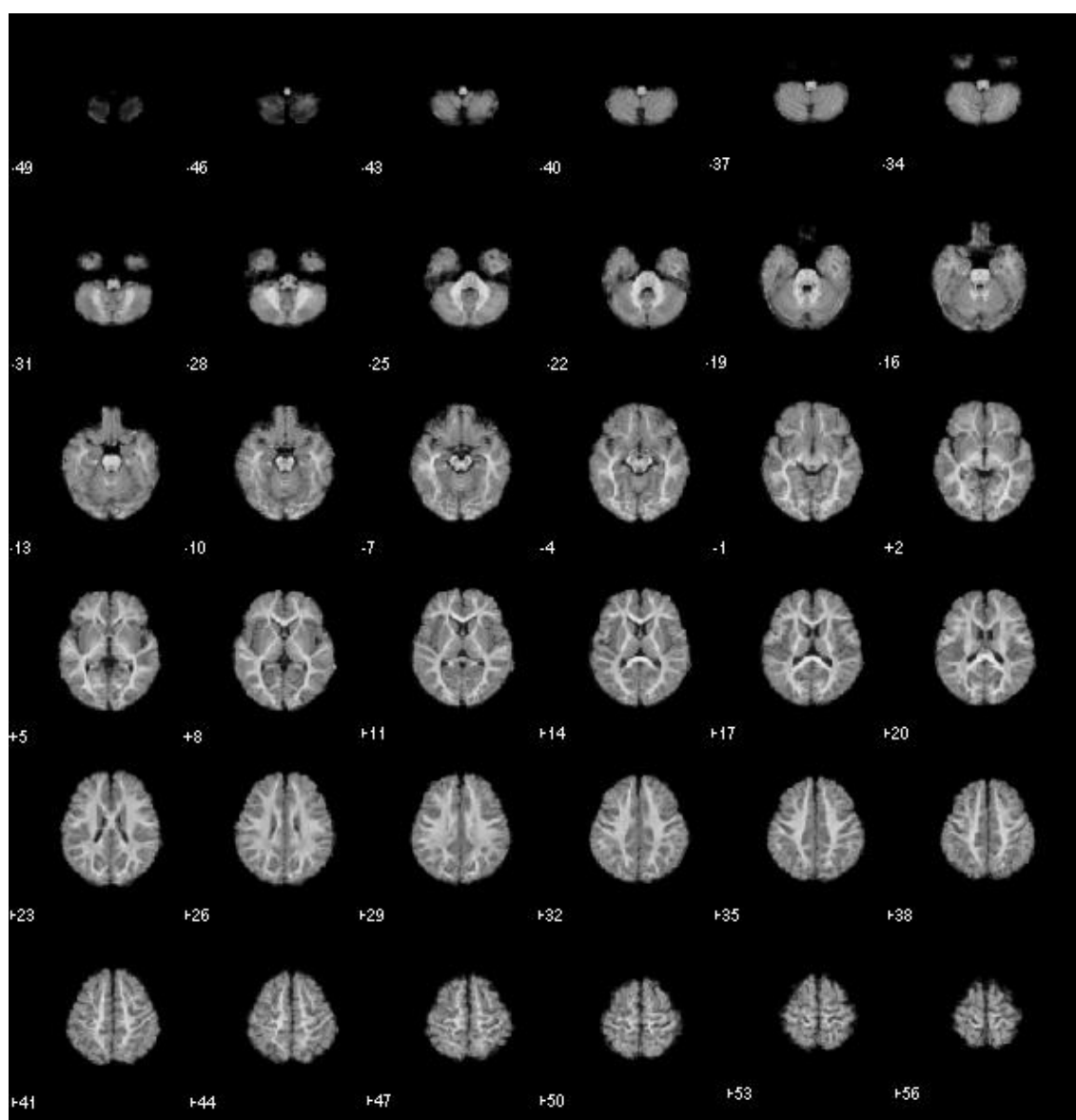


Figura 3.14. Atlante T1 gruppo 4-12 mesi

Come è possibile notare, la maggior parte delle strutture di materia bianca sono individuabili nella immagine atlante, dato che la pesatura T1 permette di visualizzare anche le fasi precoci di mielinizzazione. I fasci, che nell'immagine sono caratterizzati da intensità più alta, appaiono già definiti in particolare nella loro componente antero-posteriore e nelle loro derivazioni principali, con un buon contrasto rispetto alle zone sottocorticali non ancora mielinizzate. Anche le strutture profonde risultano ben delimitate e caratterizzate da un buon contrasto. Si osserva inoltre un segnale aumentato e una buona definizione nel tronco e nei peduncoli cerebellari, mentre il corpo calloso non risulta completamente mielinizzato. Risulta sufficientemente dettagliata anche la definizione della corteccia, dove è possibile individuare in maniera chiara le aree corticali preposte alle funzioni basilari, come le aree primarie visive, le aree primarie uditive e le aree motorie primarie. Nonostante il limitato numero di soggetti, tale definizione anatomica sia nella materia bianca che nella materia grigia indica la bontà del metodo utilizzato, che ha permesso di registrare i soggetti in maniera molto efficiente. In parte la qualità della registrazione è dovuta ad una variabilità relativamente bassa tra le immagini di partenza dei soggetti, che erano caratterizzati da una età, una dimensione e una forma dell'encefalo simili. Questo ha permesso di poter applicare deformazioni non eccessive e di effettuare una media consistente.

Atlanti T1, età 1-2 anni

In figura 1.15 si mostra l'atlante T1 nel gruppo di bambini 1-2 anni, calcolato su 6 soggetti, di età mediana 1 anno e 7 mesi, media 1 anno e 6 mesi e una deviazione standard di 3 mesi. I tempi di calcolo delle singole trasformazioni sono stati di circa 20 secondi per ogni trasformazione rigida, 35 secondi per ogni trasformazione affine e 12 minuti per ogni trasformazione non lineare.

L'atlante T1 del gruppo 1-2 anni mostra come vi sia un aumento nella definizione nei fasci di materia bianca rispetto a quanto visto nel gruppo precedente. Si osserva un contrasto meno elevato tra i fasci profondi e le zone sottocorticali, a causa dell'aumento di segnale di queste ultime, legato alla loro mielinizzazione. Diventano invece ancora più evidenti i tratti principali antero-posteriori e nella zona posteriore dell'encefalo vi è una maggiore definizione anche di fasci che si diramano da una posizione più mediale ad una più prossimale nei due emisferi. Questi fasci diretti verso la corteccia nel gruppo 4-12 mesi erano meno visibili a causa del processo di sviluppo sul quale hanno effetto

due fattori principali, il processo di pruning delle sinapsi e quello di mielinizzazione, che nel range compreso tra i 4 e gli 11 mesi è risultato essere molto disomogeneo in alcune zone a seconda dell'età del bambino (più avanzato a 11 mesi, molto arretrato a 4 mesi), con contrasti diversificati che hanno penalizzato l'effetto ottenuto con il calcolo della immagine media.

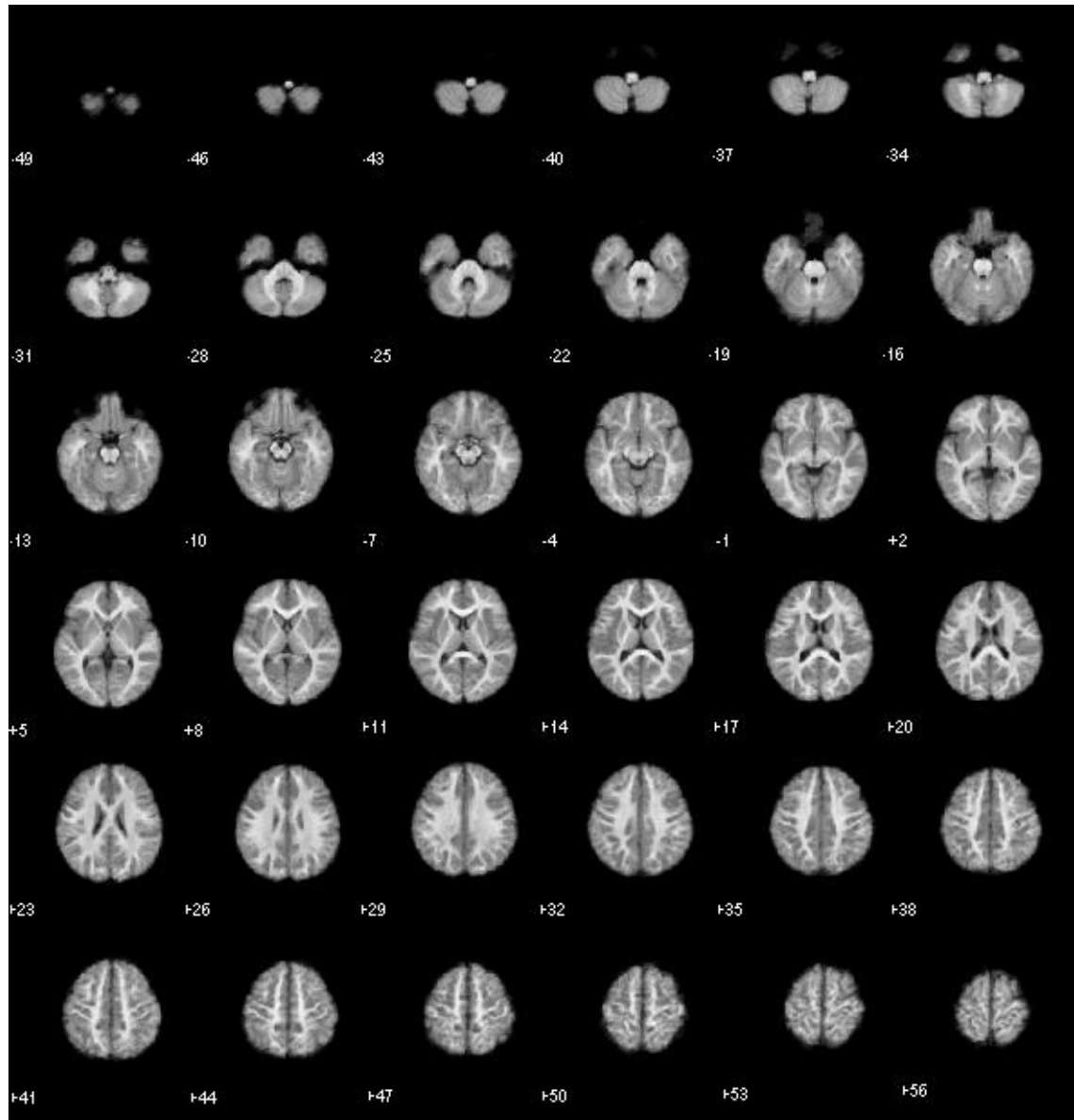


Figura 1.15. Atlante T1 gruppo 1-2 anni

Nel periodo compreso tra 1-2 anni, invece, la mielinizzazione in molte zone cerebrali è progredita e più omogeneamente rappresentata sulle immagini, descrivendo un pattern più definito. Inoltre l'utilizzo di immagini relative ad un range ristretto ad un solo anno, ha permesso di utilizzare delle immagini con caratteristiche simili in termini di

dimensioni e contrasto, con età media e mediana molto vicine a quella ottimale per il gruppo (1.5 anni) e una bassa deviazione standard.

Questo ha influito in maniera positiva sulla generazione dell'atlante poiché non è stato necessario applicare deformazioni troppo elevate, minimizzando l'effetto di rumore all'interno dell'immagine, soprattutto nella materia bianca. Un maggiore effetto di rumore si è però ottenuto all'interno della materia grigia. In questo periodo avvengono infatti numerosi cambiamenti corticali, dove insieme all'ispessimento si ha l'aumento delle circonvoluzioni. Questo è osservabile nelle immagini, dove si nota una maggiore profondità dei solchi superficiali. D'altro canto, l'aumento delle circonvoluzioni, non perfettamente sincrono all'interno del campione produce un effetto di maggiore sfocamento nelle zone dove è in atto questa trasformazione. Nell'atlante qui generato questo effetto può essere facilmente localizzato all'interno della corteccia motoria primaria e di numerose altre zone corticali.

Atlanti T1, età 3-6 anni

In figura 1.16 si mostra l'atlante T1 nel gruppo di bambini 3-6 anni. Il template è stato calcolato su 6 soggetti, di età media di 4 anni e 9 mesi, età mediana pari a 5 anni e una deviazione standard di 11.5 mesi. I tempi di calcolo delle singole trasformazioni sono risultati 30 secondi per le trasformazioni rigide, 50 secondi per quelle affini e 11 minuti e 30 minuti per le non lineari.

L'atlante in T1 mostra la ormai quasi completa mielinizzazione delle fibre di materia bianca, che vengono visualizzate con un ottimo contrasto rispetto alla materia grigia. I tratti antero-posteriori, così come le ramificazioni verso le zone corticali sono mielinizzate e ben delineate e distinguibili in tutte le regioni cerebrali. In particolare, rispetto al gruppo precedente si osserva la maggiore mielinizzazione nelle zone frontali. La materia grigia appare molto ben contrastata e si osservano una maggiore girificazione e profondità dei solchi rispetto a quanto osservato nelle popolazioni più giovani. Tuttavia, l'immagine appare relativamente rumorosa soprattutto in zona corticale, anche dopo essere stata sottoposta ad un filtraggio passabasso ($FWHM = 0.8$ mm, in modo che l'area coperta sia comparabile alla dimensione del voxel) per attenuare l'effetto di bassa definizione delle circonvoluzioni.

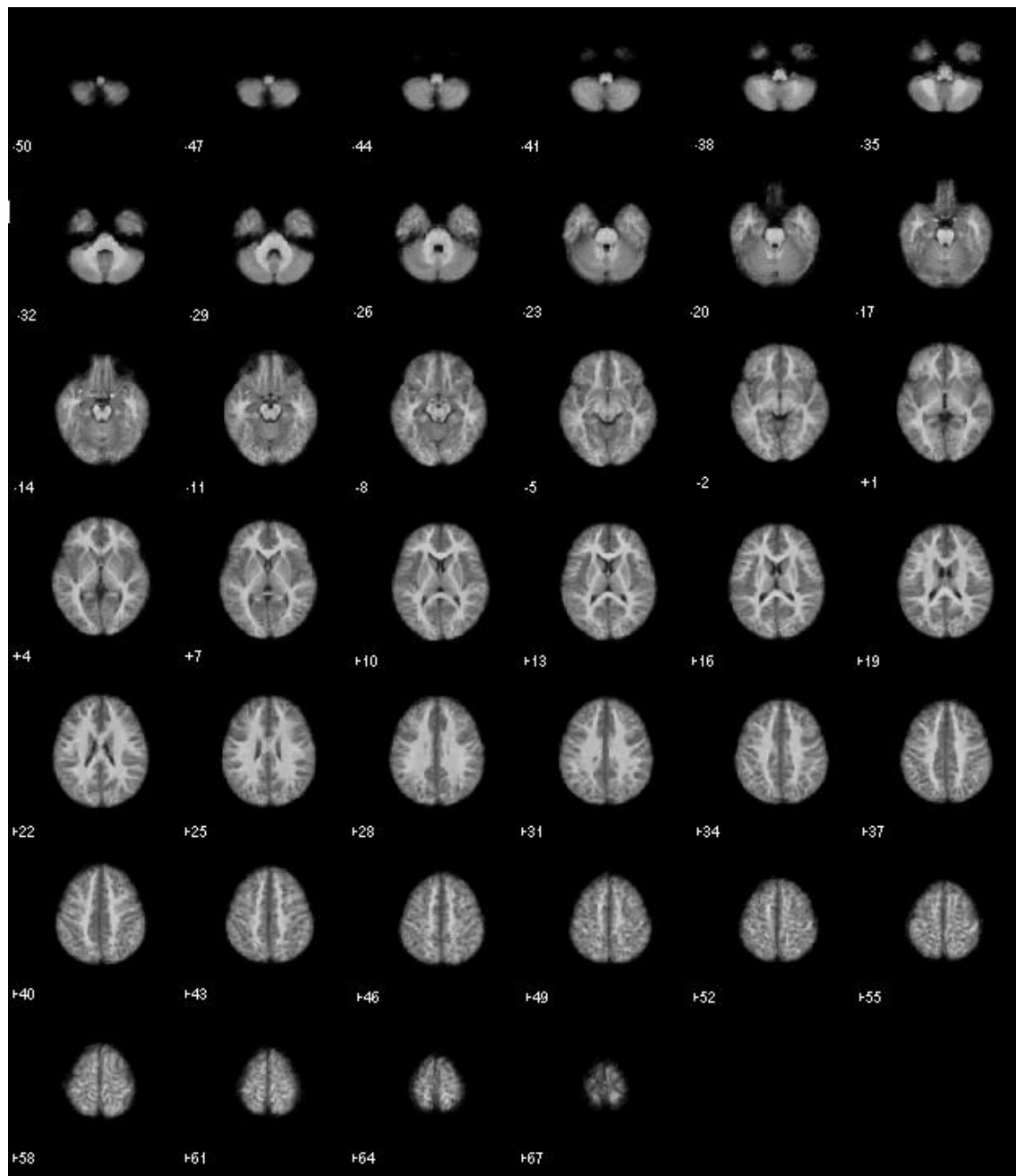


Figura 1.16. Atlante T1 gruppo 3-6 anni

Questo effetto è derivato dall'ampia variabilità nell'età dei soggetti che influenza particolarmente queste aree vicino al bordo. Infatti l'età media del campione è molto vicina a quella del range (4 anni e 8 mesi per il campione, 4 anni e 6 mesi per il range), ma la deviazione standard piuttosto alta, pari a 11.5 mesi. Le deformazioni applicate risultano piuttosto ampie e le immagini, anche dopo la registrazione, mantengono una certa variabilità. Di conseguenza, a causa del basso numero di soggetti del campione, il calcolo della media per la generazione del template, non è in grado di attenuare efficacemente queste differenze.

Atlanti T1, età 6-17 anni

In figura 1.17 si mostra l'atlante T1 nel gruppo dei ragazzini di età tra i 6-17 anni. Il template è stato calcolato su 16 soggetti, di età media pari a 9 anni e 7.5 mesi, mediana pari a 9 anni e una deviazione standard di 2 anni e 10 mesi. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono stati di 30 secondi per le trasformazioni rigide, di 50 secondi per le trasformazioni affini e 30 minuti per le trasformazioni non lineari.

L'atlante T1 della popolazione 6-17 anni è in grado di descrivere in maniera molto accurata la anatomia della popolazione corrispondente. Nell'immagine è possibile apprezzare l'ottimo contrasto tra la materia bianca e la materia grigia. In particolare, la prima appare perfettamente delineata e completamente mielinizzata e organizzata nei fasci per raggiungere tutte le zone corticali. Nella seconda è possibile individuare tutti i solchi in maniera molto definita ed appare caratterizzata da una profondità e una girificazione molto maggiore rispetto a quanto osservato nei campioni precedenti. Anche tutte le zone sottocorticali e profonde risultano perfettamente delineate. La materia grigia in questa fase, sembra essere caratterizzata da maturazione, permettendo di osservare un assottigliamento della corteccia, dovuto ad una diminuzione di volume rispetto a quanto riscontrato negli atlanti in età più precoce. La bontà dell'atlante ottenuto è da implicare a molteplici fattori: da una parte alle immagini di partenza, di buona qualità e con un contrasto molto ben definito, dall'altra al metodo, che è stato ottimizzato sulla popolazione in modo da tenere conto dell'ampia variabilità dei soggetti reclutati all'interno di questo intervallo di età.

Il campione, infatti, è composto da 16 soggetti con età media di 9 anni e 7 mesi, minore rispetto ai 12 anni di età media nel range ottimale, e con una deviazione standard relativamente bassa, ad indicare una predominanza di soggetti più vicini al limite inferiore del gruppo.

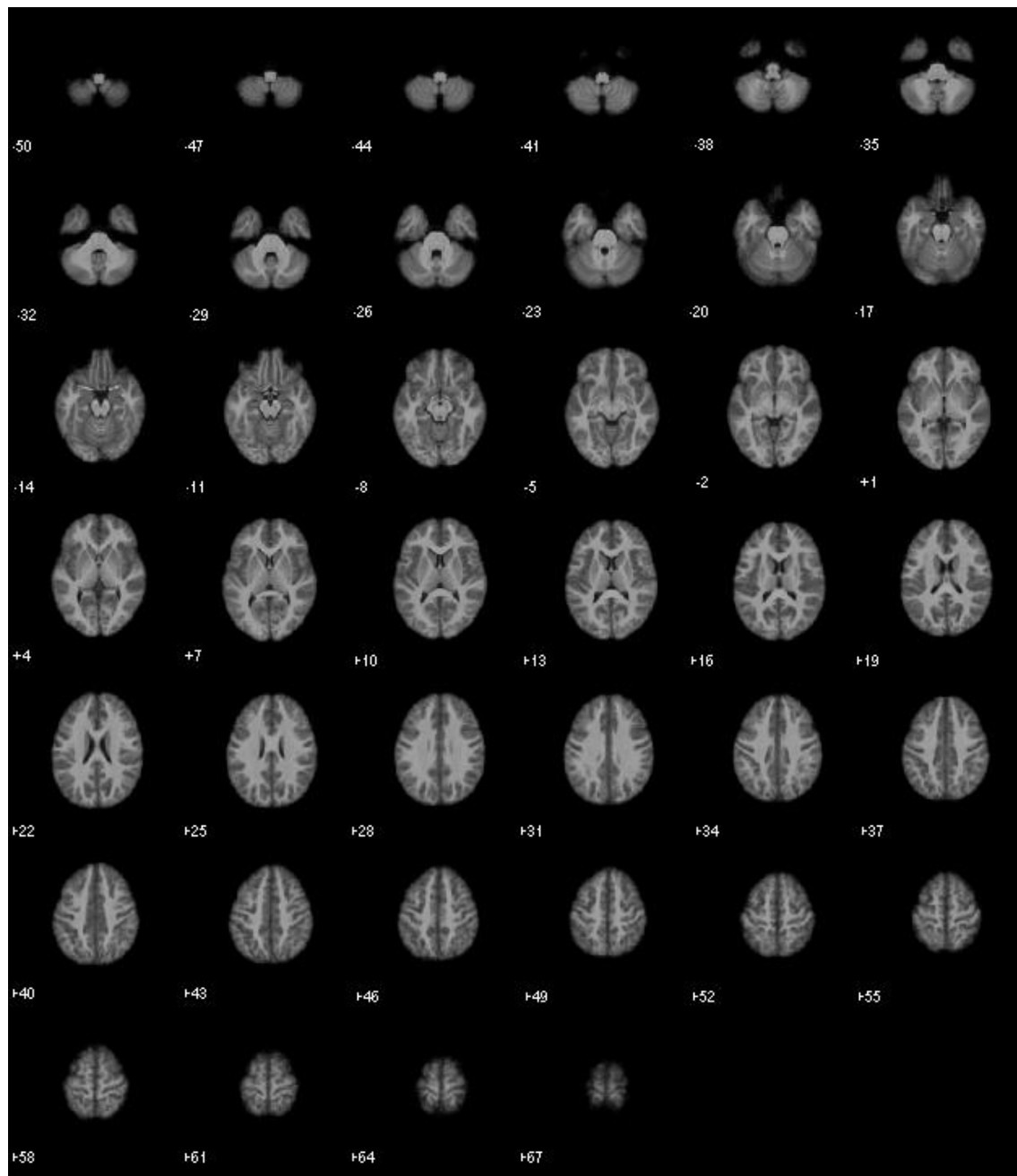


Figura 1.17. Atlante T1 gruppo 6-17 anni

Un ruolo fondamentale, in questo campione, ha però svolto la numerosità. L'utilizzo di un numero di soggetti più alto rispetto a quello utilizzato negli altri gruppi ha permesso una stima più accurata e il calcolo di una media più consistente tra le immagini dei soggetti. Come osservabile per esempio in figura 1.18, la differenza tra un atlante generato utilizzando gli stessi passaggi e gli stessi parametri su un numero differente di soggetti, ovvero 9 e 16, è altamente significativa.

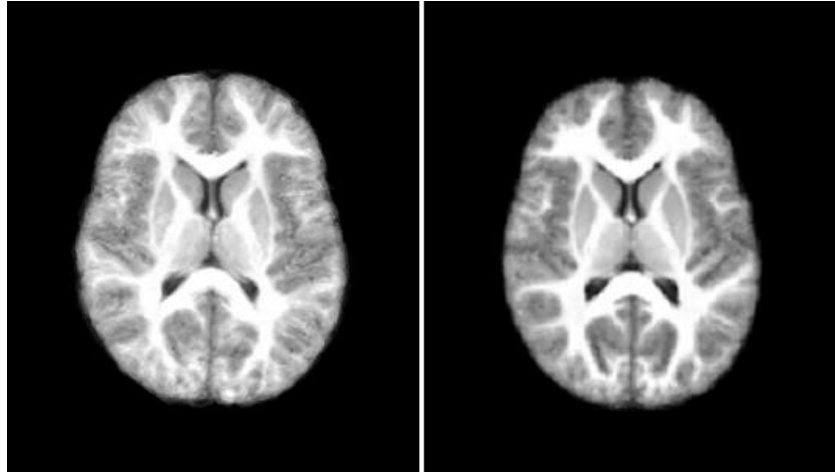


Figura 1.18. Confronto tra l'atlante creato con 9 (a sinistra) e 16 (a destra) soggetti.

L'utilizzo di un numero di soggetti più elevato ha infatti permesso di utilizzare la media per la correzione delle variabilità inter-soggetto. Il calcolo della media permette di attenuare gli effetti di rumore nelle zone a più alta variabilità, come per esempio le zone corticali, generando un maggiore effetto di sfocamento dei bordi delle strutture. Allo stesso tempo però, è in grado di ottenere un definitivo aumento di contrasto e una migliore definizione delle strutture.

Gli atlanti T2

Atlanti T2, età 4-12 mesi

In figura 1.19 si mostra l'atlante T2 range sui bambini 4-12 mesi. Il template è stato calcolato sugli stessi 5 soggetti utilizzati per l'atlante T1. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono però maggiori a causa della diversa risoluzione spaziale delle immagini utilizzate. Sono riconducibili a circa 1 minuto e 30 secondi per ogni trasformazione rigida, 3 minuti per ogni trasformazione affine e 35 minuti per ogni trasformazione non lineare.

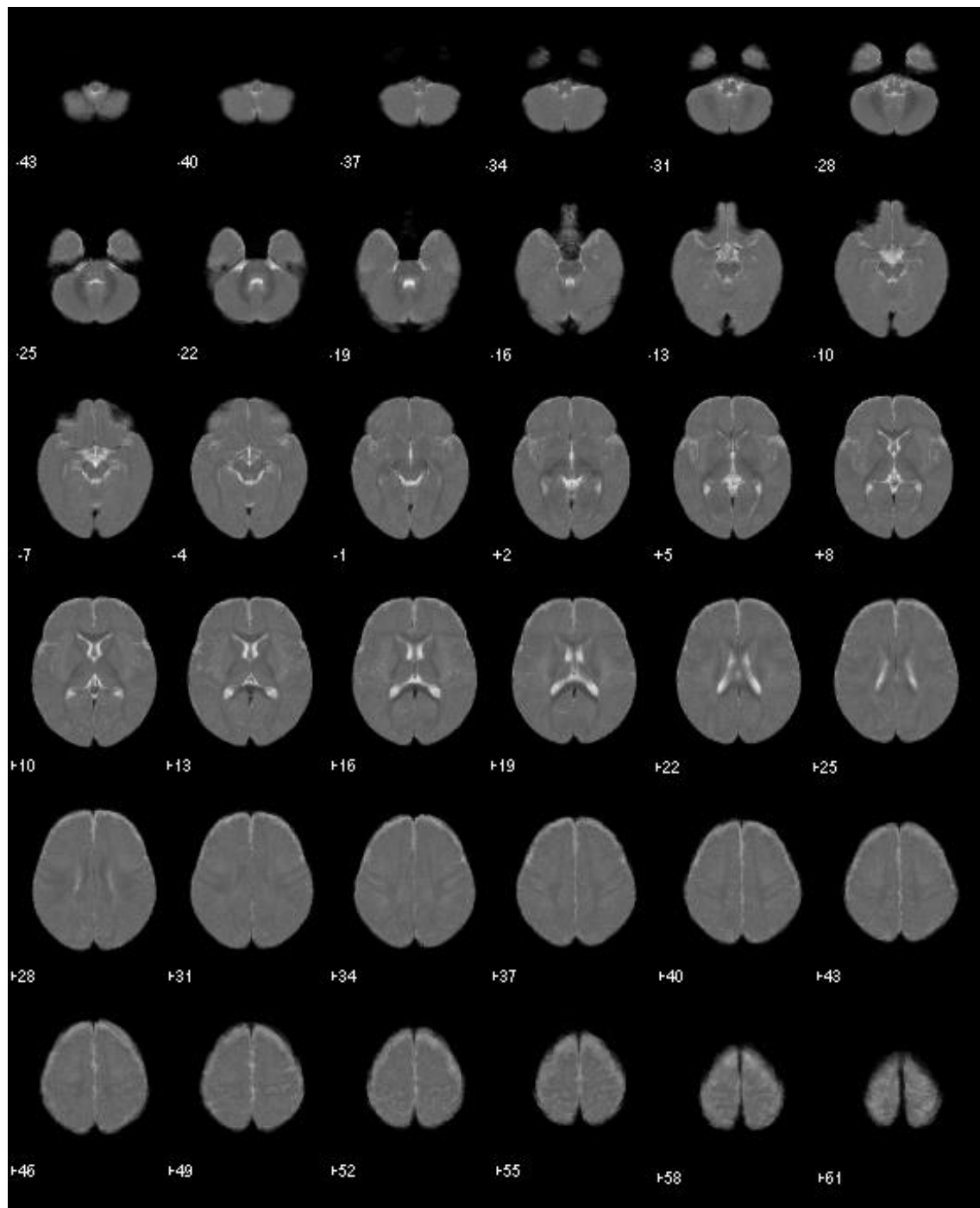


Figura 1.19. Atlante T2 gruppo 4-12 mesi

Nella figura si può notare come il contrasto sia piuttosto scarso se confrontato con quello della T1. Questa caratteristica è tipica di questo range di età in cui la composizione dei tessuti non permette di visualizzare in maniera adeguata le varie strutture cerebrali. Infatti, come già messo in evidenza in precedenza, coesistono, allo stesso tempo, dei fattori che riducono il contrasto T2: una riduzione della componente acquosa, un aumento della mielinizzazione e un inspessimento corticale. D'altra parte,

la forte sensibilità di questa pesatura al contenuto di acqua libera permette di seguire meglio il processo di mielinizzazione ed, in particolare, di distinguere le zone già mielinizzate da quelle in fase di premyelinizzazione.

Come si può vedere dalla figura, le strutture con maggiore intensità rispetto agli altri tessuti (WM e GM), ovvero quelle caratterizzate da una componente liquida e da un segnale più alto (come i ventricoli), appaiono ben registrati, così come le strutture profonde più vicine ad essi (putamen, talamo, caudato, ...) che risultano ben riconoscibili e con bordi ben delineati dai fasci della capsula interna che risultano maggiormente contrastati rispetto al resto della GM e della WM. Allontanandosi dalla zona più profonda dell'encefalo ed avvicinandosi alla corteccia, dove vi è un maggiore effetto dovuto alla variabilità dei soggetti, è visibile un effetto di sfocamento, che non permette una buona definizione delle strutture di interesse, né in profondità né in superficie. Il massimo effetto di sfocamento, dovuto alla grande disomogeneità dei soggetti sia in termini di dimensioni del cervello che di posizionamento iniziale, si ha nella regione apicale e nelle ultime sezioni del cervelletto, dove la risoluzione dell'atlante risulta più limitata, anche a causa di artefatti riconducibili riallineamento delle sezioni iniziali rispetto alla linea AC-PC.

Atlanti T2, età 1-2 anni

In figura 1.20 si mostra l'atlante T2 range dei bambini 1-2 anni. Il template è stato calcolato sugli stessi 6 soggetti utilizzati per l'atlante T1. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono però aumentati come a causa della maggiore dimensione delle immagini utilizzate. Sono riconducibili a circa 1 minuto e 40 secondi le trasformazioni rigide, 2 minuti e 30 secondi quelle affini e 40 minuti per le non lineari.

Con l'aumentare dell'età si osserva come le immagini siano caratterizzate da un contrasto migliore e invertito rispetto a quanto era possibile osservare nelle immagini T1 dello stesso gruppo d'età. Come nel gruppo 4-12 mesi, anche nell'atlante T2 relativo al gruppo 1-2 anni sono riscontrabili i medesimi problemi di elaborazione.

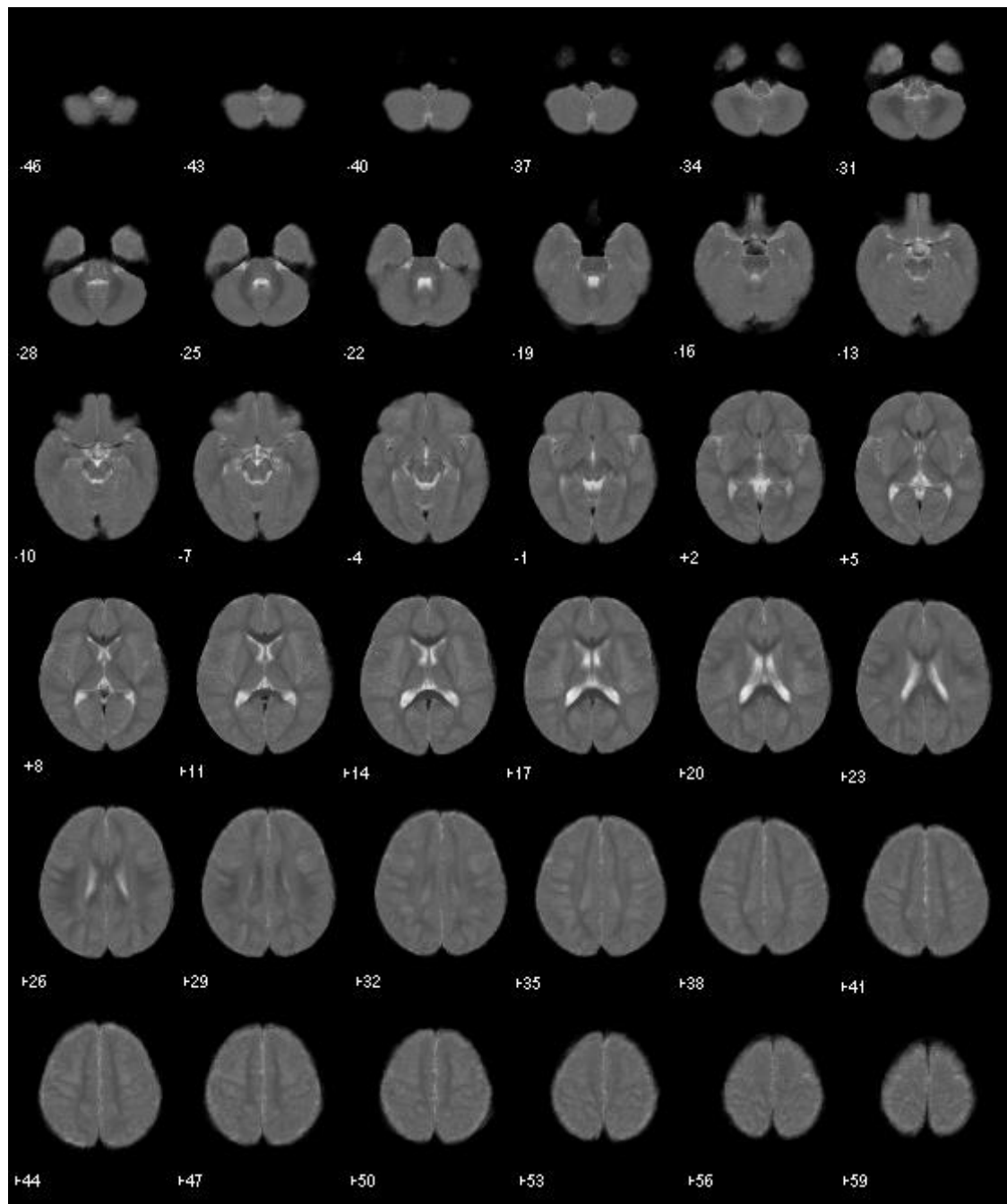


Figura 1.20. Atlante T2 gruppo 1-2 anni

Si osserva infatti come, a fronte di un migliore contrasto, che permette una migliore registrazione delle strutture relative ai fasci di materia bianca profonda e delle zone ad alto contenuto liquido nelle sezioni centrali, sia presente un forte effetto di rumore all'interno delle strutture corticali, che aumenta in zona apicale e nelle ultime sezioni del cervelletto. Questo rumore è dovuto alla variabilità tende ad offuscare le caratteristiche della materia grigia, tuttavia, nonostante la presenza di questa rumorosità, nel template è possibile iniziare ad osservare una maggiore complessità nella

girificazione della corteccia rispetto a quanto osservato nel gruppo più giovane. Dal punto di vista anatomico, si può osservare una progressione nella mielinizzazione. In particolare si osserva la mielinizzazione nelle zone sottocorticali, nelle radiazioni e nel corpo calloso, così come una progressione di mielinizzazione nelle zone posteriori che non viene riscontrata invece nelle zone frontali.

Atlanti T2, età 3-6 anni

In figura 1.21 si mostra l'atlante T2 nel range 3-6 anni, che è stato calcolato su 7 soggetti, uno in più rispetto a quelli utilizzati per l'atlante T1. Infatti la T1 di un soggetto era stata scartata a causa del movimento eccessivo. La età mediana rimane di quasi 5 anni (4 anni, 11 mesi e 15 giorni), così come la deviazione standard rimane di 7.5 mesi, mentre la media si abbassa di un mese, diventando 4 anni e 8 mesi. Anche i tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono aumentati rispetto alla T1 ed equivalgono a circa 1 minuto e 45 secondi per ogni trasformazione rigida, 2 minuti per ogni trasformazione affine e 45 minuti per ogni trasformazione non lineare.

Nel range di età tra i 3 e i 6 anni di età l'encefalo ha già raggiunto la completa mielinizzazione della materia bianca, e questo è osservabile anche nella pesatura T2, dove i fasci sono individuabili come le strutture più ipointense ben contrastate rispetto alla materia grigia che, in confronto, risulta avere intensità più elevata. Nonostante le sezioni siano spesse e le immagini abbiano una bassa risoluzione spaziale lungo la direzione z, si riesce tuttavia ad osservare un aumento nella definizione della corteccia rispetto all'atlante dei soggetti più giovani, in particolare nelle sezioni centrali, mentre nelle sezioni più apicali è possibile riscontrare una maggiore presenza di solchi corticali. Rispetto al gruppo precedente si osserva inoltre una significativa progressione della mielinizzazione nelle zone frontali.

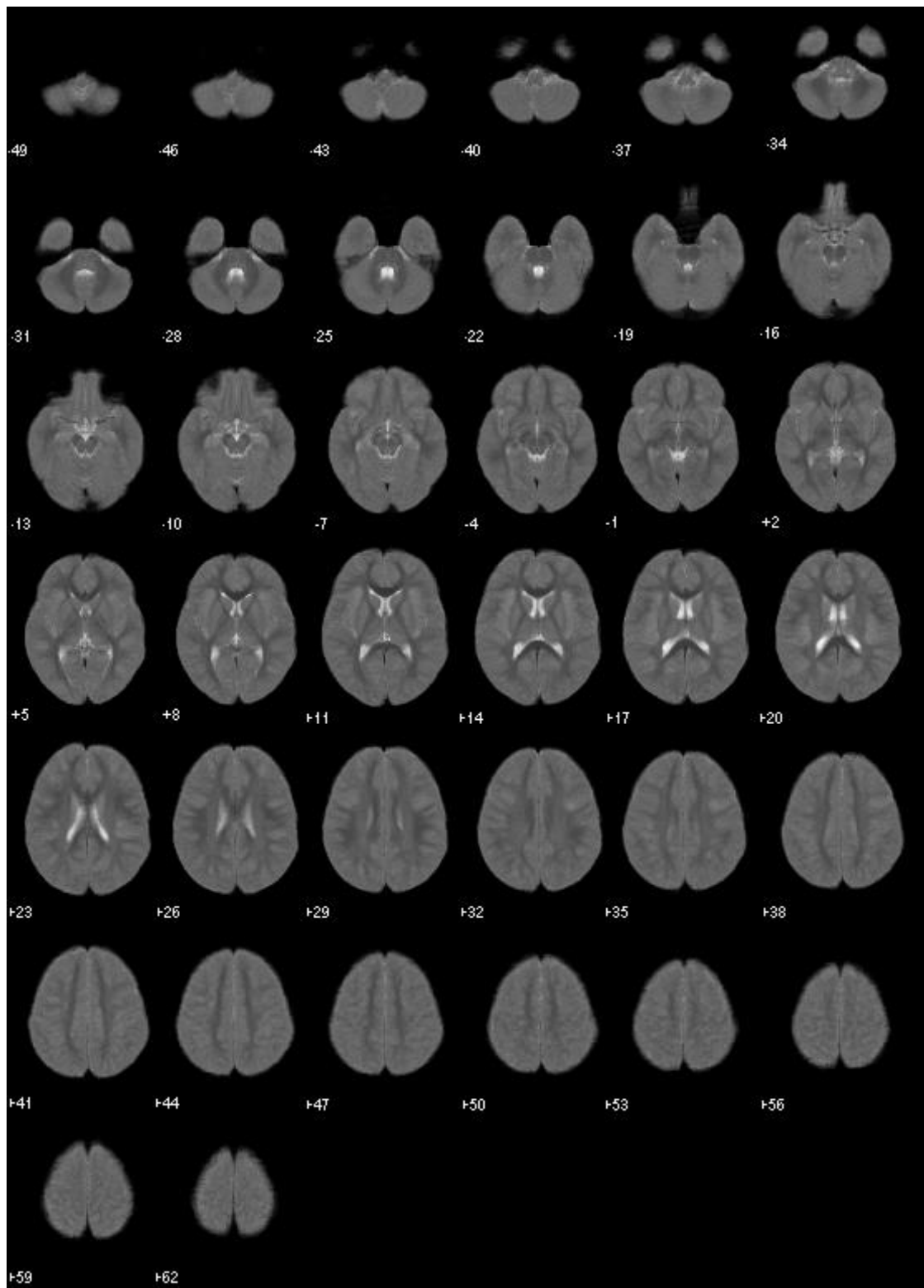


Figura 1.21. Atlante T2 gruppo 3-6 anni

Atlanti T2, età 6-17 anni

In figura 1.22 si mostra l'atlante T2 nel range 6-17 anni che è stato calcolato sugli stessi 16 soggetti utilizzati per l'atlante T1. Anche questa volta tempi di calcolo medi delle

single trasformazioni sono però maggiori rispetto a T1. Essi sono circa 1 minuto e 10 secondi per ogni trasformazione rigida, 1 minuto e 45 secondi per ogni trasformazione affine e 25 minuti per ogni trasformazione non lineare.

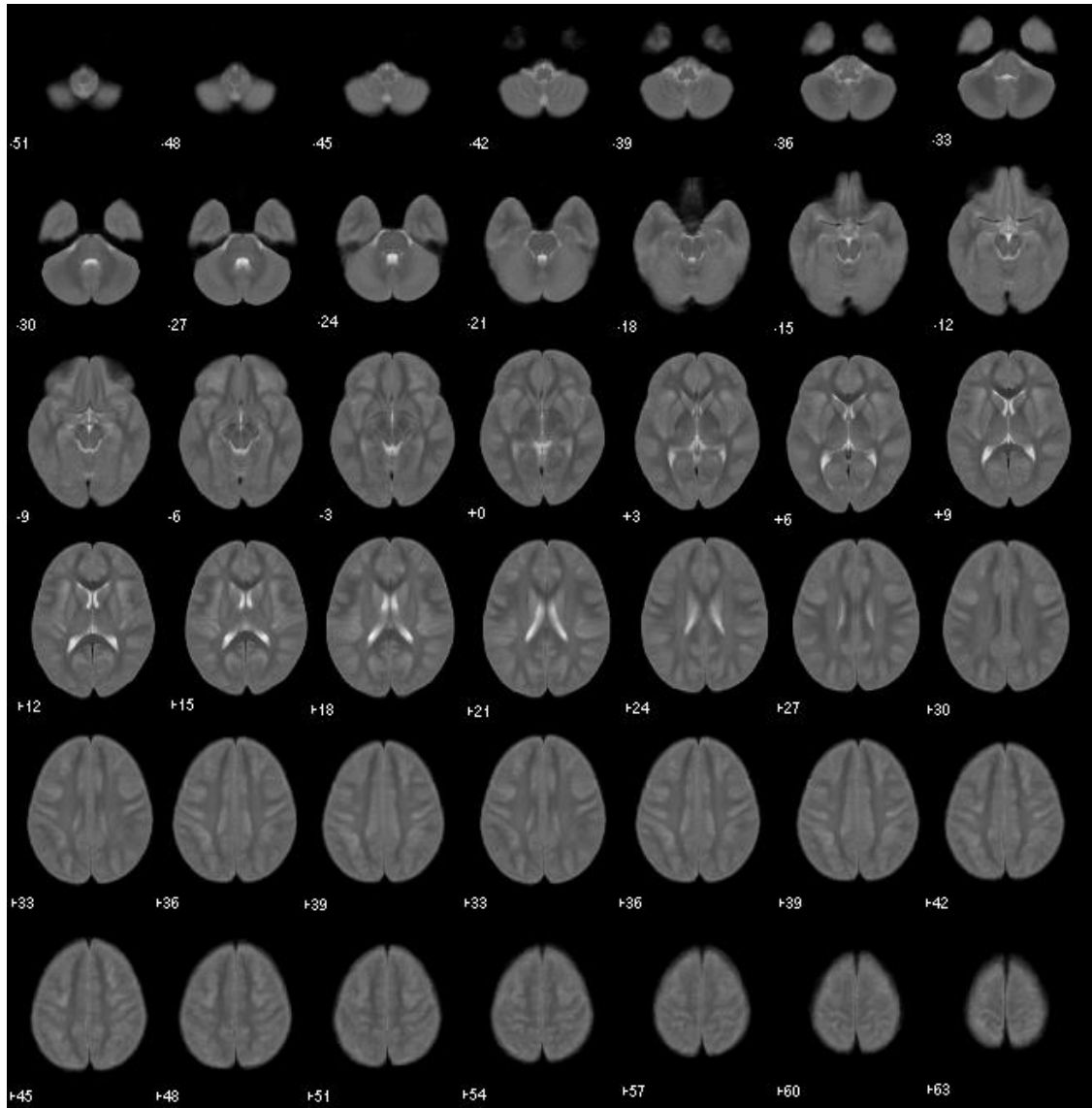


Figura 1.22. Atlante T2 gruppo 6-17 anni

L'utilizzo di un numero maggiore di soggetti nel gruppo 6-17 anni ha permesso di ottenere risultati molto soddisfacenti anche nella pesatura T2. Come è possibile osservare, la variabilità tra i soggetti (in termini di forma e dimensione) e gli effetti di rumore sono stati ottimamente minimizzati, incrementando in maniera significativa il contrasto e la definizione delle strutture. Benché la risoluzione spaziale sia comunque bassa lungo la direzione testa-piedi, è possibile descrivere in maniera più che sufficiente l'anatomia anche in posizione apicale e nelle ultime sezioni del cervelletto, dove l'utilizzo di un basso numero di soggetti aveva generato criticità negli altri gruppi. In

particolare, è molto interessante osservare come sia migliorata la definizione dei bordi, della materia bianca, ma soprattutto della materia grigia. È infatti possibile osservare l'assottigliamento corticale e riconoscere chiaramente le aree corticali preposte a numerose funzionalità di basso ed alto livello, a partire da quelle basilari, quali visive, uditive e motorie, che negli atlanti di età inferiori risultavano meno definite e più difficilmente individuabili con sicurezza. Rispetto ai gruppi precedenti risultano maggiormente contrastate anche le zone sottocorticali che ormai sono in fase avanzata di mielinizzazione.

Gli atlanti FA (DTI)

Atlanti FA, età 4-12 mesi

In figura 1.23 si mostra l'atlante FA nel range 4-12 mesi. Il template è stato calcolato sugli stessi 5 soggetti utilizzati per l'atlante T1 e T2. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono molto inferiori a quelli di T2 e T1 e sono stati calcolati pari a 3 secondi, 15 secondi e 2 minuti rispettivamente per ogni trasformazione rigida, affine e non lineare. Per l'analisi, le mappe FA sono state convertite in immagini dove il valori di FA sono stati normalizzati su una scala 0-1000. All'interno del template di questo gruppo sono inclusi valori di FA compresi tra un minimo di 0 e un massimo di 500, con un picco a 120.

E' possibile osservare come in questa fascia di età, i valori di FA indichino una anisotropia nella maggior parte dei fasci di materia bianca. Questa può essere ricondotta o all'avvenuta mielinizzazione di alcuni fasci, dove i valori di FA sono molto alti, oppure in anche solo alla organizzazione delle fibre all'interno del fascio. Infatti, anche in assenza di mielina (premielinizzazione), l'organizzazione compatta e parallela delle fibre di WM genera una maggiore resistenza della diffusione in direzione trasversale alla fibra, generando un maggiore contrasto tra diffusione longitudinale e trasversale che si traduce in un valore di anisotropia intrinseco. Questo può essere osservato in particolare in corrispondenza delle porzioni prossimali delle fibre e vicino alla corteccia e nei tratti associativi, che sono caratterizzati da valori di anisotropia maggiori rispetto a quelli della materia grigia, nonostante la mielinizzazione vera e propria non sia ancora avvenuta. Mentre valori molto alti di anisotropia, relativi al reale processo di

mielinizzazione si possono osservare nello splenio, nel corpo calloso e nella porzione posteriore del cervelletto.

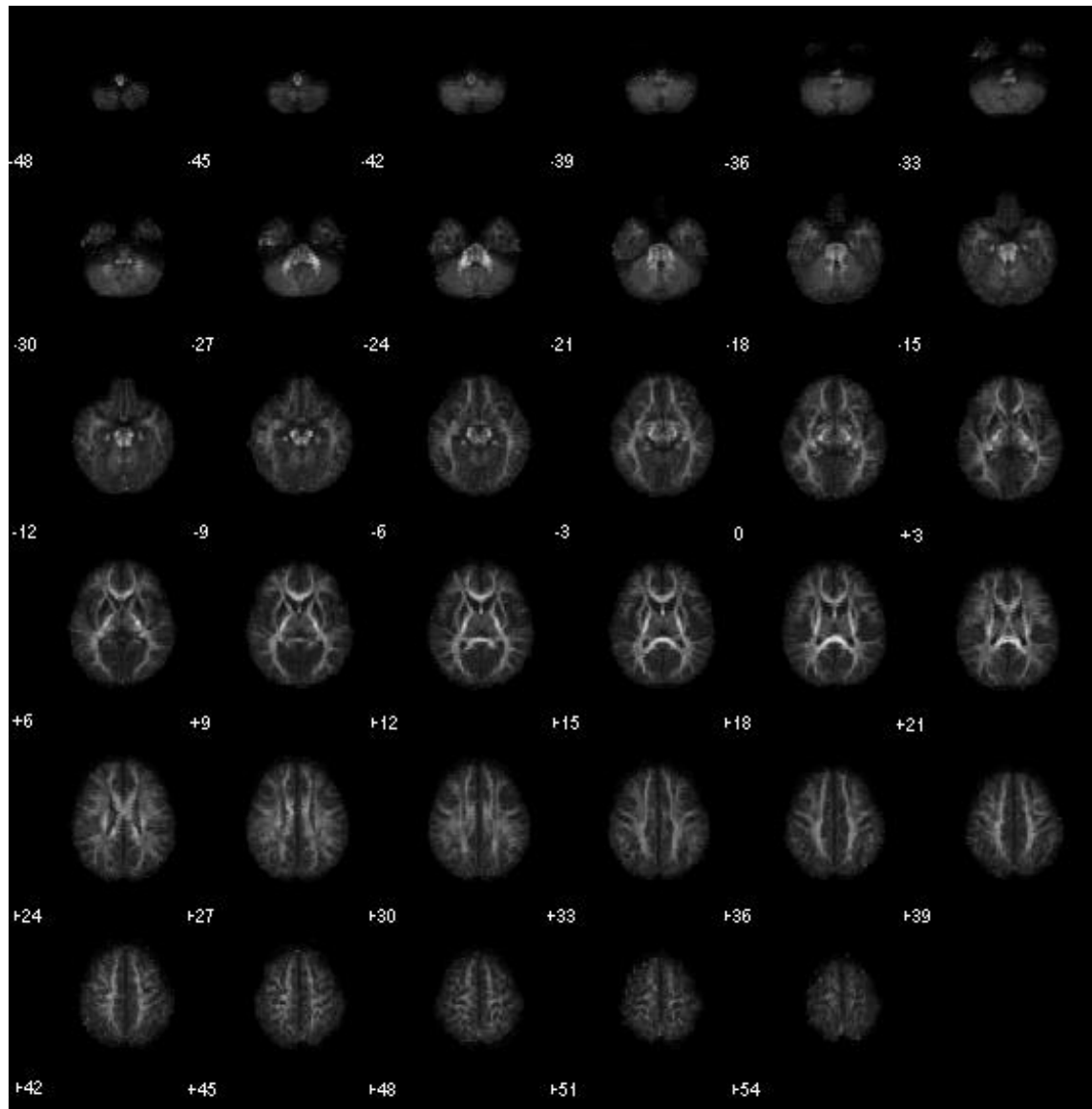


Figura 1.23. Atlante FA gruppo 4-12 mesi

Atlanti FA, età 1-2 anni

In figura 1.24 si mostra l'atlante FA nel range 1-2 anni. Il template è stato calcolato sugli stessi 6 soggetti utilizzati per l'atlante T1 e T2. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono molto inferiori a quelli di T2 e T1 e sono stati calcolati pari a 3 secondi per ogni registrazione rigida, 6 secondi per ogni registrazione affinel e 2 minuti e 20 secondi per ogni registrazione non lineare. Per l'analisi, le mappe FA sono state convertite in immagini dove il valori di FA sono stati normalizzati su una scala 0-

1000. All'interno del template di questo gruppo sono inclusi valori di FA compresi tra un minimo di 0 e un massimo di 500, con un picco a 130.

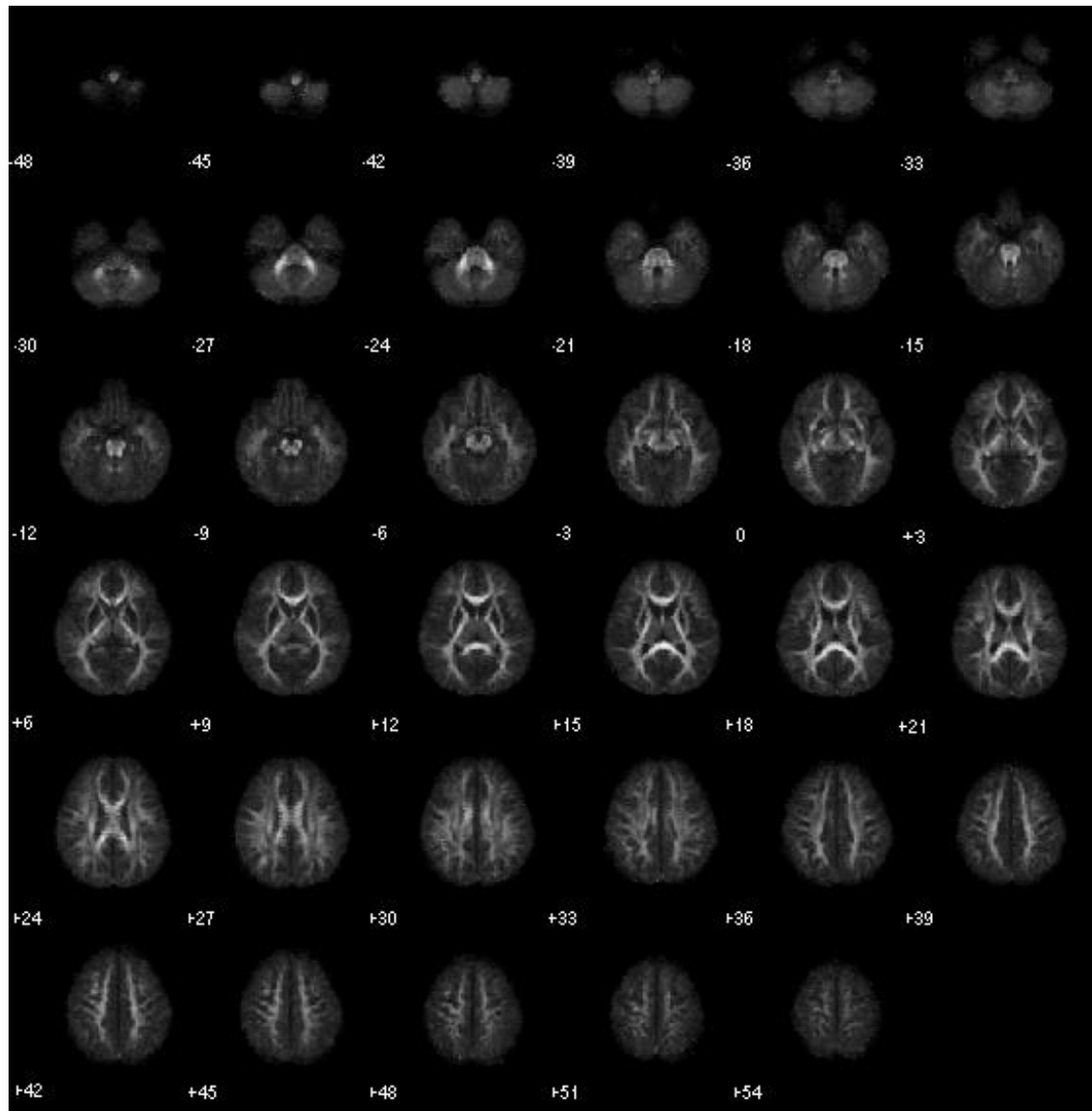


Figura 1.24. Atlante FA gruppo 1-2 anni

In questo range di età è possibile apprezzare un aumento del valore di FA in alcuni tratti precedentemente non ancora mielinizzati. In particolare si osserva un pattern di aumento di anisotropia nei fasci periferici posteriori che appaiono più delineati in corrispondenza di connessioni con la corteccia e nella porzione anteriore del corpo calloso, che appare adesso completamente mielinizzato.

Atlanti FA, età 3-6 anni

In figura 1.25 si mostra l'atlante FA nel range 3-6 anni, calcolato sui 7 soggetti utilizzati per l'atlante T2. I tempi di calcolo per le singole trasformazioni sono stati stimati pari a circa 3 secondi, 6 secondi e 2 minuti e 10 secondi rispettivamente per ogni trasformazione rigida, affine e non lineare. Per l'analisi, le mappe FA sono state convertite in immagini dove il valori di FA sono stati normalizzati su una scala 0-1000.

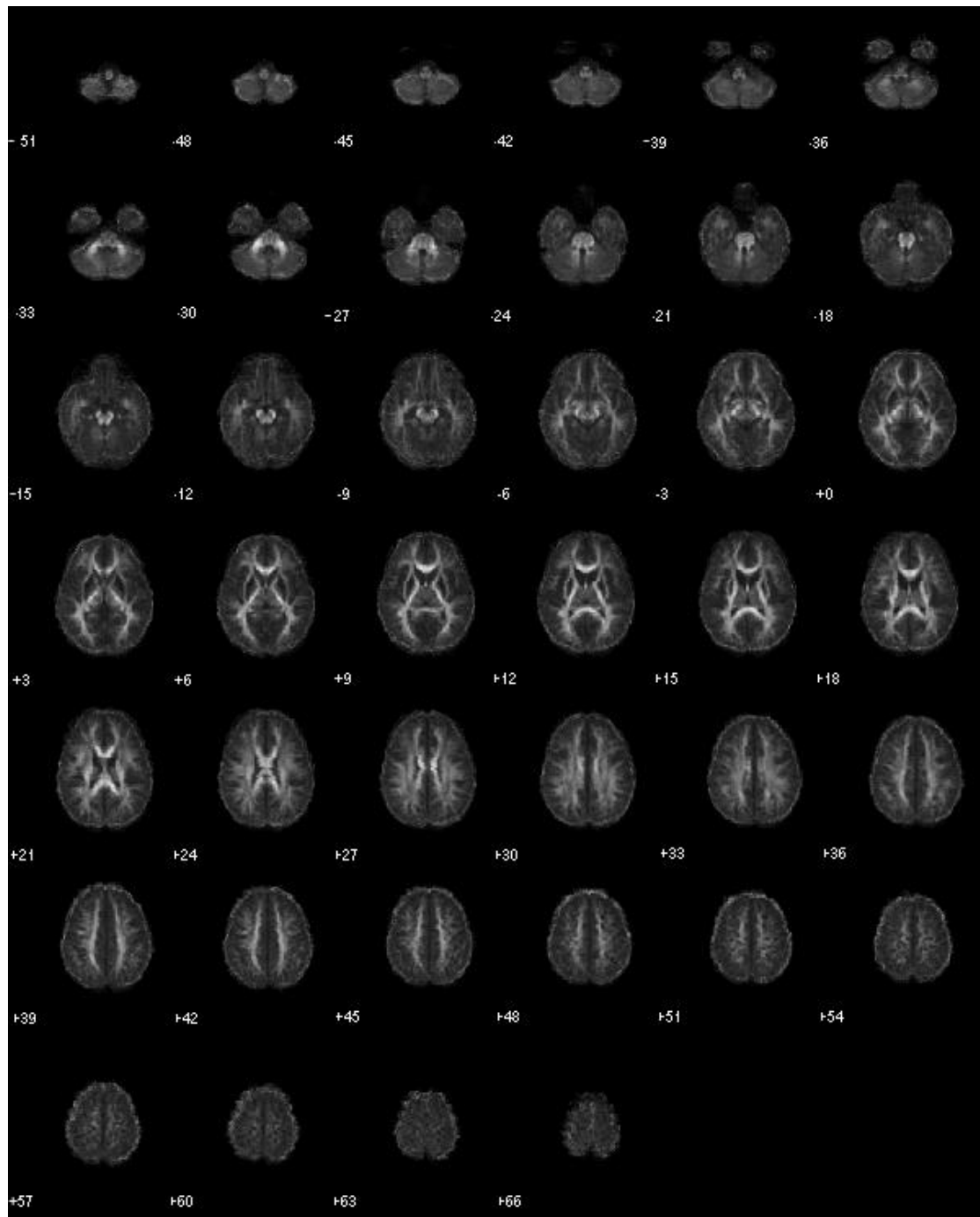


Figura 1.25. Atlante FA gruppo 3-6 anni

All'interno del template di questo gruppo sono inclusi valori di FA compresi tra un minimo di 0 e un massimo di 700, con un picco a 140.

Dopo i 3 anni di età, con mielinizzazione molto avanzata si osserva come la maggior parte dei fasci siano ormai caratterizzati da anisotropia molto elevata, con un totale aumento dei valori di FA se comparati con i gruppi precedenti. Sono osservabili fasci ben delineati anche spostandosi verso il vertice e una buona definizione del corpo calloso nella sua interezza.

Atlanti FA, età 6-17 anni

In figura 1.26 si mostra l'atlante FA range 6-17 anni. Il template è stato calcolato su 15 dei 16 soggetti utilizzati per l'atlante T1 e T2, poiché l'acquisizione DTI di uno dei soggetti è risultata mossa. L'età media del campione è di 9 anni e 9 mesi, la mediana di 9 anni e 8 mesi, la deviazione standard di 2 anni e 11 mesi. I tempi di calcolo medi delle singole trasformazioni sono stati stimati di 4 secondi per le trasformazioni rigide, 8 secondi per le trasformazioni affini e 3 minuti per le trasformazioni non lineari. Per l'analisi, le mappe FA sono state convertite in immagini dove il valori di FA sono stati normalizzati su una scala 0-1000. All'interno del template di questo gruppo sono inclusi valori di FA compresi tra un minimo di 0 e un massimo di 800, con un picco a 145.

Il gruppo dei soggetti più grandi, dove ormai la mielinizzazione è terminata è possibile osservare come i fasci di WM siano caratterizzati da alti valori di FA, suggerendo che il sistema di connessioni strutturali dell'encefalo sia ormai giunto a sua completa maturazione. In particolare, è possibile apprezzare i fasci del tronco, che risultano ben delineati e che non sono visualizzati utilizzando le altre pesature, e l'ottima definizione anche del passaggio cortico-corticale.

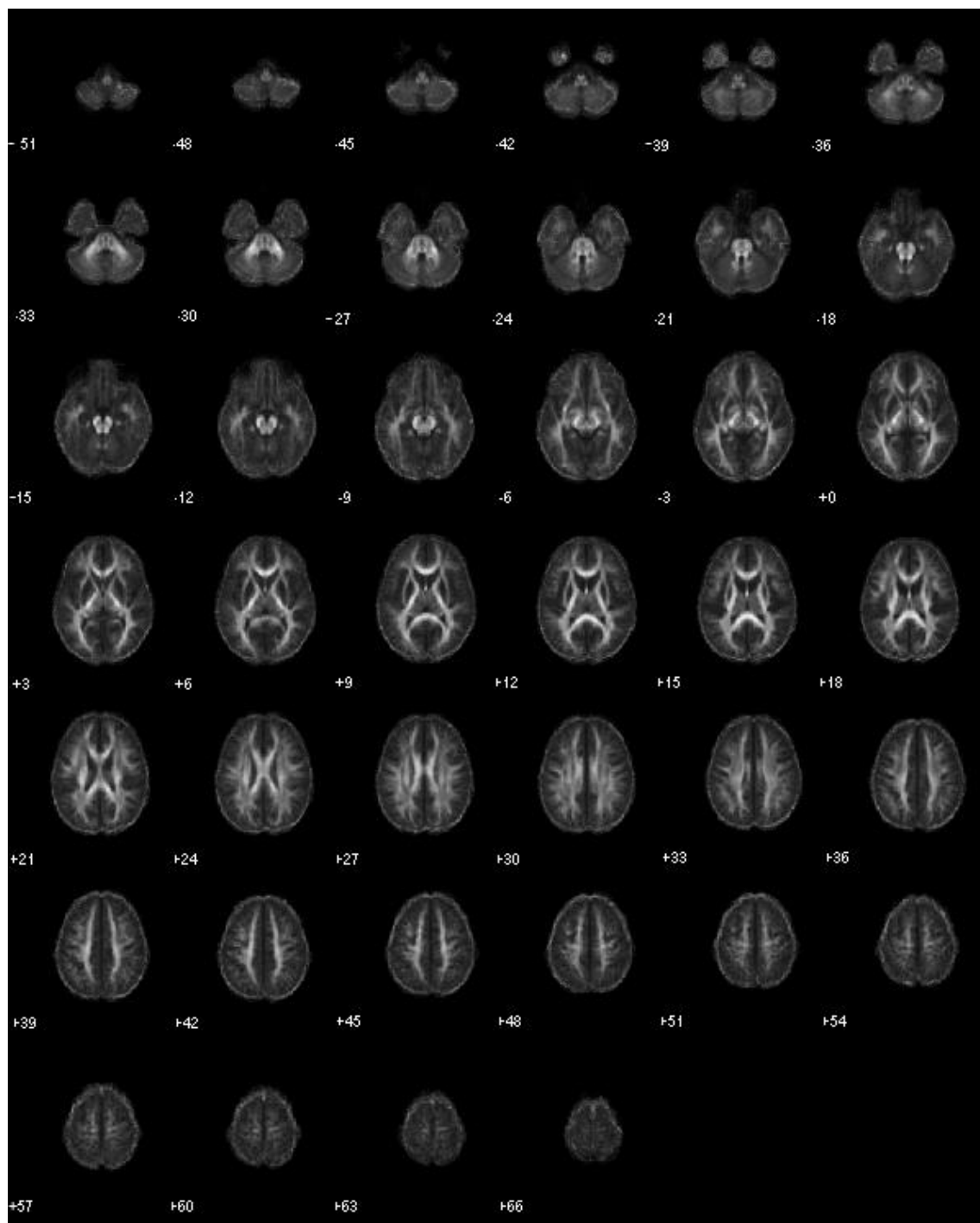


Figura 1.26. Atlante FA gruppo 6-17 anni

1.6 Discussione

1) Numero di soggetti

Come descritto nelle precedenti sezioni, il processo di acquisizione è stato effettuato utilizzando sequenze ottimizzate per ogni fascia di età, in modo da ottenere il miglior contrasto fra i tessuti. Questo è particolarmente importante per le immagini T1 dei neonati, dove la quantità d'acqua nei tessuti non permette di discernere tra le varie strutture, e nelle immagini T2, dove il contrasto si modifica in maniera sensibile all'interno del range di età. Infatti, se nei neonati la pesatura T2 è quella più adatta a descrivere la anatomia dei soggetti, intorno ai sei mesi e fino all'anno di vita diventa particolarmente difficile discriminare tra i vari tessuti utilizzando questa pesatura. L'utilizzo di sequenze ottimizzate e la divisione in fasce di età fa però nascere la necessità di un reclutamento abbastanza elevato.

Il campione attualmente a nostra disposizione è composto in totale da 36 soggetti di cui: 1 soggetto nel gruppo 0-3 mesi (1 maschio), 6 soggetti nel gruppo 4-12 mesi (4 femmine e 2 maschi), 6 soggetti nel gruppo 1-2 anni (3 femmine e 3 maschi), 7 soggetti nel gruppo 3-6 anni (4 femmine e 3 maschi) e 16 soggetti nel gruppo 6-17 anni (7 femmine e 9 maschi). All'interno dei 36 soggetti reclutati, non è al momento stato acquisito alcun soggetto appartenente al gruppo 2-3 anni. Nonostante i centri partecipanti al progetto con a disposizione un macchinario RM 3T fossero 10, i centri che hanno effettivamente contribuito alla raccolta dei dati dei soggetti normali sono stati solo 3. In effetti, di tutti i soggetti inclusi nel data base di normali, ben 28 sono stati reclutati dal nostro centro. Nella pratica, evidentemente pochissimi centri sono stati in grado di acquisire esami di bambini che soddisfano i requisiti richiesti.

La difficoltà nel reclutamento dei soggetti è in parte legata alle motivazioni cliniche per cui i bambini effettuano l'esame di risonanza. Anche in presenza di un esame negativo e di un encefalo che può essere definito normale, alcuni tipi di patologie non rendono possibile il reclutamento, poiché le implicazioni cerebrali a lungo termine non sono sempre prevedibili. Questo è l'esempio dei soggetti che sopraggiungono all'esame per problematiche metaboliche, relative ad episodi di crisi epilettiche oppure per problemi ormonali che causano deficit nella crescita o pubertà precoce. Questi casi, rappresentano una porzione rilevante del numero totale di bambini che ogni anno effettuano un esame

RM, e il fatto di non poter essere inclusi nello studio, anche se classificati come negativi, influisce in maniera significativa sul numero dei soggetti sani arruolati.

Un'altra criticità relativa al reclutamento risiede nel fatto che gli scanner 3T a scopo clinico in popolazioni pediatriche ha iniziato ad essere diffuso solo negli ultimi anni. In molti ambienti ospedalieri per le popolazioni pediatriche vengono utilizzati preferibilmente macchinari a 1.5 Tesla nonostante possa essere presente nel reparto anche macchinario 3 T. Questo, anche nel nostro caso, è risultato essere frequentemente un limite nel reclutamento di soggetti sani, poiché le immagini, benché di buona qualità, non erano state acquisite su macchinario ad alto campo.

Infine, è anche da tenere in considerazione la difficoltà intrinseca legata alla esecuzione di esami in pazienti pediatrici. In molti casi, l'esecuzione dell'intero esame RM richiede tempi molto lunghi, perché può essere necessario acquisire di un alto numero di immagini per verificare lo stato patologico o la normalità. Nei soggetti pediatrici, l'esecuzione di un esame lungo influisce però significativamente sulla loro capacità di collaborazione. È abbastanza frequente che un bambino sveglio non sia in grado di rimanere fermo per molto tempo e che di conseguenza sia difficoltoso portare a termine l'intero esame senza che alcune immagini risultino mosse. Anche nei soggetti più piccoli, che effettuano esame in sedazione, il bambino può avere dei movimenti involontari durante il sonno o può svegliarsi. Questi fattori introducono artefatti da movimento che inficiano la qualità delle immagini. Tuttavia, non è sempre possibile ripetere l'acquisizione di queste immagini, poiché il nostro protocollo viene integrato in quello clinico ed è necessario tener conto delle esigenze e della collaborazione del paziente. Ad esempio, a seguito di un esame molto lungo e difficoltoso da parte del bambino, quando da un punto di vista clinico le immagini possono essere ritenute sufficientemente risolte o non fondamentali per la diagnosi finale nel contesto dell'intero esame, esse non vengono ripetute. Anche in presenza di soggetti sani talvolta le immagini acquisite secondo il protocollo verranno scartate per la creazione degli atlanti perché non ritenute di qualità sufficiente per essere utilizzate, introducendo una ulteriore limitazione al numero di soggetti reclutati.

Il numero di soggetti è, per il momento, decisamente inferiore alle aspettative del nostro progetto multicentrico. Nonostante questo, siamo comunque riusciti a generare degli atlanti di buona qualità.

E' dunque da auspicare che nel corso dei prossimi mesi si possano raccogliere altri soggetti anche da altri centri ottenendo risultati ancora migliori sui range di età, in particolare quelli in cui abbiamo una bassa numerosità.

2) Criticità relative al numero e la variabilità dei soggetti per il calcolo dei template

Come è chiaramente mostrato in figura 1.18, per il range di 6-17 anni che include molti più soggetti rispetto a quelli degli altri range (16 soggetti vs 1/6/6/7), un incremento del numero di campioni aumenta decisamente la qualità degli atlanti ottenibili. Il solo aumento dei soggetti da 9 a 16 ha permesso una definizione decisamente migliore di tutta la anatomia dell'encefalo.

La numerosità del campione e la variabilità tra i soggetti sono quindi due dei parametri che maggiormente influiscono sulla qualità del risultato di registrazione. In generale, nella creazione di qualsiasi atlante, per ottenere buoni risultati è preferibile avere un alto numero di campioni e una bassa variabilità. Quando questo non è possibile, il miglior compromesso è che i due parametri (numerosità e variabilità) seguano lo stesso andamento: con una bassa variabilità infatti l'utilizzo di un campione poco numeroso sarà meno critico, mentre in un campione con una variabilità alta l'utilizzo di un numero maggiore di soggetti permetterà di minimizzare la variabilità inter-soggetto. Nel nostro studio, i range di età sono stati definiti in modo da ottenere dei campioni abbastanza omogenei, tuttavia ogni gruppo sarà comunque caratterizzato da una variabilità intrinseca dovuta alle differenze tra i soggetti, che potrà essere differente da gruppo a gruppo. Una variabilità intrinseca maggiore è attesa in quei range dove le modifiche nella conformazione cerebrale sono più significative: dal punto di vista strutturale questo accade nel range 0-3 mesi e 4-12 mesi, dove i processi di mielinizzazione sono molto veloci. Nei range tra i 3-6 e 6-17 anni, le strutture hanno invece una variazione molto lenta, ma la dimensione dell'encefalo può variare in maniera significativa tra i vari soggetti (ad esempio tra una bambina di 6 anni e un ragazzo di 17). Se nei gruppi tra i 3 e i 17 anni la maggior parte del problema si riduce ad un fattore di scala, nei bambini tra la nascita e l'anno di vita avere un numero basso di soggetti è più critico, perché sarà necessario applicare deformazioni maggiori, con il rischio di introdurre artefatti. Questo è necessario perché per ottenere dei buoni atlanti le immagini sottoposte alla media devono essere caratterizzate da un certo grado di sovrapposizione. Se la variabilità è bassa, le immagini di partenza sono caratterizzate da encefali con età,

contrasto, dimensione, forme simili e avranno già in partenza un'alta percentuale di sovrapposizione tra le strutture. Di conseguenza non sarà necessario utilizzare deformazioni molto forti e il numero di soggetti mediati per ottenere un buon risultato può essere minore. Al contrario, immagini con alta variabilità saranno caratterizzate da minore sovrapposizione: in questo caso calcolare la media su un alto numero di soggetti permette di generare un effetto di smoothing che minimizza questa variabilità e mette in risalto le caratteristiche comuni. Se il numero di soggetti è ridotto, non sarà possibile sfruttare questo effetto e sarà necessario applicare deformazioni maggiori (ad esempio introducendo anche l'utilizzo di una registrazione affine a 12 parametri) per aumentare il grado di sovrapposizione delle immagini prima di calcolare la media.

3) Criticità relative alla pesatura

In questo lavoro, un terzo parametro che ha influenza sulla bontà della creazione del template insieme a numerosità e variabilità, è la pesatura dell'immagine. La dipendenza dalla pesatura è dovuta alle caratteristiche dell'immagine.

Ad esempio, le mappe FA, benché siano caratterizzate da risoluzione spaziale non particolarmente alta, presentano un contrasto molto elevato tra materia bianca (caratterizzata da alti valori di FA) e il resto dell'encefalo (caratterizzato da FA minori). Poiché i fasci di WM sono spesso localizzati nelle zone cerebrali che presentano una minore variabilità, le deformazioni necessarie ad una registrazione accurata sono piccole ed è possibile arrivare ad un alto grado di sovrapposizione delle mappe anche in presenza di un numero di soggetti relativamente basso. Di conseguenza, siamo in grado di creare dei template medi di buona qualità senza necessitare di un'alta numerosità.

Diverso è il comportamento per le immagini T1 e le T2. Le T1 possiedono una buona risoluzione in tutti e tre i piani e questo si riflette in una buona capacità di stimare le deformazioni in tutte le direzioni, soprattutto quando le immagini sono caratterizzate da un buon contrasto. Come precedentemente descritto, l'applicazione di deformazioni elevate diminuisce la sovrapposizione delle strutture causando un effetto di sfocamento. Di conseguenza, in caso di alta variabilità del campione, questo effetto può essere contrastato solo con l'utilizzo un maggior numero di soggetti.

Infine, la T2 possiede una scarsa risoluzione sull'asse z a causa dell'alto spessore delle fette di acquisizione. Questo fa che, se non tutti i soggetti sono acquisiti mantenendo un posizionamento identico, anche in presenza di un campione con variabilità relativamente bassa il segnale contenuto all'interno di ogni fetta possa descrivere

sezioni differenti all'interno dei diversi soggetti. In questo caso, la variabilità del campione risulta addirittura aumentata e la stima delle deformazioni per raggiungere una sovrapposizione delle strutture è resa più difficile dalla non corrispondenza di segnale all'interno delle sezioni delle immagini. Di conseguenza, in particolare in quei range di età dove il contrasto T2 è scarso e non è possibile distinguere in maniera netta tutte le strutture (4-12 mesi e 1-2 anni), per ottenere un atlante in grado di descrivere l'anatomia nel dettaglio sarà necessario ricorrere ad un elevato numero di soggetti.

4) Criticità relative al metodo di elaborazione delle immagini

a. BET

Per ottenere una registrazione di immagini ottimale è stato necessario effettuare una accurata estrazione dei tessuti cerebrali tramite BET. Questo processo si basa parallelamente sullo studio dell'istogramma dell'immagine e sulla propagazione di una mesh di superficie. L'istogramma permette di definire i valori di intensità massima e minima ed una soglia relativa alla superficie di separazione encefalo/non encefalo. Quest'ultimo valore di soglia dovrebbe servire ad identificare i bordi dei tessuti cerebrali e fornire un limite di espansione della mesh che, partendo dall'interno dell'encefalo, è in grado di deformarsi fino al raggiungimento del bordo corticale. Questo metodo è completamente automatizzato ed è in grado di ottenere risultati molto accurati nelle immagini degli adulti, dove il contrasto delle strutture di interesse è molto ben definito. Al contrario, nei soggetti pediatrici, in particolare in immagini pesate in T1 dove fino ad una certa età vi è una forte componente di rumore e il contrasto è molto limitato, BET presenta una accentuata difficoltà nell'individuare il bordo tra le strutture encefaliche e quelle esterne, generando risultati molto spesso inesatti. Nonostante la sperimentazione di diverse soglie per l'ottenimento della superficie migliore, si è resa necessaria una correzione delle maschere risultanti mediante un intervento di segmentazione manuale (abbastanza oneroso in termini di tempo) dell'encefalo nelle immagini T1 e delle zone maggiormente soggette ad errore nelle immagini T2 e DTI, quali quelle relative ai bulbi oculari. Visto il numero limitato di soggetti, questo non ha influito in maniera particolare sulla tempistica della parte di pre-elaborazione delle immagini. Nel caso, però, di una auspicabile numerosità molto elevata di campioni, è necessario implementare un metodo automatico per la segmentazione delle regioni critiche.

b. Trasformazioni

Per la creazione degli atlanti un ruolo fondamentale è stato ricoperto dalle trasformazioni effettuate. La trasformazione rigida, calcolata tramite media delle trasformazioni di un soggetto nello spazio degli altri, è stata utilizzata per ricondurre le immagini allo stesso spazio di riferimento. A differenza delle trasformazioni affini e non lineari, la registrazione rigida non è stata sottoposta ad una media ponderata, ma una media aritmetica, in quanto durante lo step di registrazione rigida non è stato ritenuto necessario tenere in considerazione le differenze tra i soggetti per la definizione dello spazio finale comune. Questo passaggio è stato introdotto per correggere la variabilità nella posizione iniziale dell'encefalo all'interno del campo di vista dell'immagine. Infatti, benché durante le acquisizioni il FOV sia stato mantenuto costante all'interno del gruppo e l'origine dell'immagine fosse stata riposizionata nella medesima posizione anatomica, non sempre lo spazio in cui i soggetti erano stati acquisiti risultava coerente. Tuttavia, nelle immagini T2, dove lo spessore di ogni sezione è relativamente elevato, il riposizionamento delle immagini ha generato artefatti dovuti alla mancanza di segnale in seguito al ricampionamento dell'immagine nel nuovo spazio. Questo genere di artefatti, che in un campione numeroso viene mitigato tramite il calcolo delle immagini medie, su un numero limitato di soggetti ha un grande impatto e può essere minimizzato unicamente con un campionamento più fitto, utilizzando quindi uno spessore delle sezioni minore, oppure minimizzando il più possibile le differenze di posizionamento iniziale dei singoli soggetti.

Nel passaggio di registrazione affine è stato scelto un numero diverso di parametri dipendentemente dall'età, utilizzando una trasformazione a 12 parametri per i gruppi dei bambini di età inferiore ai 3 anni e una trasformazione a 9 parametri per i bambini dai 3 ai 17 anni. In quella popolazione dove sono attesi cambiamenti anatomici e dimensionali molto elevati, questo ha permesso di calcolare delle deformazioni maggiori già dal passaggio di registrazione affine, diminuendo l'onere computazionale nella fase di registrazione non lineare. Questa scelta è stata effettuata in seguito all'ispezione visiva delle immagini e dal risultato di alcune prove di registrazione, da cui è emerso che la somma di deformazioni minori ottenute durante i diversi passaggi, in particolare nelle fasce di età minori, era in grado di stimare una trasformazione migliore introducendo minori deformazioni artefattuali all'interno delle immagini. L'utilizzo di una trasformazione affine a 9 parametri seguita da una non lineare, in

presenza di una popolazione di soggetti molto differenti, introduceva infatti degli effetti di distorsione della immagine durante l'applicazione di ogni singola trasformazione. Nella applicazione della trasformazione media, l'artefatto finale che veniva introdotto nell'immagine risultava proporzionale alla peso della trasformazione nella media ponderata.

Nel passaggio di trasformazione non lineare i parametri λ e di spaziatura della griglia hanno giocato un ruolo fondamentale. Esempi di atlanti e trasformazioni non lineari calcolate usando il metodo FFD in letteratura, hanno indicato come il parametro λ sia normalmente definito in maniera sperimentale e come generalmente sia definito pari a 0.001. λ definisce la penalizzazione della deformazione non lineare. Nei soggetti dove è attesa una deformazione maggiore dovuta ad una maggiore variabilità del campione, come ad esempio i gruppi 0-3 mesi, 4-12 mesi e 6-17 anni, un valore di λ maggiore (ad ex. 0.01) è in grado di calcolare deformazioni maggiori e più accurate. Questo processo fornisce risultati ottimi su una trasformazione singola, quando si vuole far perfettamente corrispondere l'immagine trasformata a quella di riferimento. Tuttavia, nella generazione di atlanti, una trasformazione così elevata tra soggetti molto differenti non ha effetto di minimizzare la variabilità del campione e si traduce in una scarsa sovrapposizione delle strutture. Questo produce un effetto di maggiore sfocamento nelle zone dove vi è una maggiore variazione di segnale, come la corteccia, e risulta particolarmente forte nei gruppi dove il numero di soggetti è limitato o dove la non corrispondenza delle strutture nei diversi campioni è molto accentuata a causa di un alto spessore delle fette dell'immagine (ex. nella pesatura T2). Di conseguenza, per limitarne gli effetti, è stato utilizzato un parametro univoco per tutti i gruppi e tutte le pesature pari a $\lambda=0.001$. Un medesimo ragionamento è stato effettuato nella scelta della spaziatura della griglia, in modo da non calcolare deformazioni troppo elevate. In letteratura alcuni gruppi [Serag, 2012; Aljabar, 2008] hanno presentato linee guida per la definizione dei valori di spaziatura, δ , dove viene suggerito che la griglia abbia una densità molto minore rispetto alla risoluzione dell'immagine, in modo che essa non sia mai maggiore di 0.4 volte la dimensione della griglia. Ne consegue che al massimo livello di risoluzione della trasformazione, la griglia non possa avere spaziatura minore di 2.5 volte la risoluzione della immagine. In base a tali considerazioni, inizialmente era quindi stato definito un valore di δ a massima risoluzione assiale pari a 1.5 mm per le immagini T2, 2.5 mm per le T1, 3.5 mm per DTI. Tuttavia, come il valore λ , anche la

spaziatura della griglia influisce direttamente sulla dimensione delle deformazioni calcolate, in quanto una griglia più fitta permette una deformazione maggiore, generando il medesimo effetto di sfocamento che si ottiene tramite l'utilizzo di un valore di λ più elevato. Anche in questo caso è quindi stata definita una griglia che risultasse abbastanza fitta, ma che permettesse un compromesso sull'ampiezza delle deformazioni, in modo da calcolare delle deformazioni non lineari significative e allo stesso tempo di non perdere risoluzione nelle regioni corticali degli atlante. Inoltre, l'utilizzo di una griglia non eccessivamente fitta ha anche permesso di ridurre i tempi computazionali delle trasformazioni e di ottenere dei risultati in tempi accettabili (la durata massima di una singola trasformazione è 45 minuti), soprattutto in previsione di un reclutamento più cospicuo. Le δ , sono quindi state definite più grandi nelle immagini con maggiore dimensione del voxel (T1 3D e DTI) dove è stato impostato un valore di spacing iniziale $\delta=20$ mm in ogni direzione (corrispondente a 20 mm nel primo livello di risoluzione, 10 mm nel secondo e 5 mm nel terzo). La definizione del valore di δ diventa più complessa nelle immagini T2, dove ad un problema relativo alla variabilità delle dimensioni cerebrali viene sommata la diversa campionatura dell'intero volume cerebrale, dovuta allo spessore di ogni proiezione assiale. Il campionamento effettuato ad uno spessore di 3 o 4 mm infatti diminuisce in maniera sensibile la risoluzione lungo l'asse testa-piedi e non permette una perfetta corrispondenza delle strutture all'interno della stessa fetta, nemmeno dopo il processo di interpolazione legato al reslicing delle sezioni ad 1-1.5 mm, aumentando l'imprecisione in queste zone di ampia variabilità. In questo caso, per venire incontro alle esigenze di queste immagini, lo spacing iniziale è stato impostato a 5 mm nelle direzioni del piano assiale e 10 lungo lo spessore della sezione (corrispondenti ad una risoluzione della griglia di trasformazione massima pari a 1.25x1.25x2.5 mm).

Capitolo 2.

La risonanza magnetica funzionale in Resting State (RS-fMRI)

2.1.1. Introduzione alla risonanza funzionale in Resting State

L'imaging RM viene comunemente utilizzato per la descrizione dell'anatomia e delle strutture che compongono l'encefalo, tuttavia lo studio della sola morfologia non è in grado di spiegare il funzionamento cerebrale. Fino a qualche tempo fa le uniche immagini funzionali erano quelle ottenibili con tecniche di Medicina Nucleare (PET, SPECT). Nel corso delle ultime due decadi, nell'ambito delle neuro immagini si sono sviluppate alcune nuove tecniche anche basate sulla RM che si pongono come obiettivo lo studio della funzionalità cerebrale: una di queste è la risonanza magnetica funzionale (functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI).

Questa permette di mettere in corrispondenza una regione cerebrale ed una funzionalità e rende possibile correlare l'anatomia dell'encefalo con le capacità preposte allo svolgimento di compiti, sia basilari che complessi.

La fMRI si basa sul meccanismo emodinamico strettamente correlato con l'attività neuronale chiamato segnale BOLD (Blood Oxygen Level Dependent), andando ad analizzare in maniera non invasiva il richiamo di ossigeno da parte delle aree cerebrali durante la loro attività. L'effetto BOLD, che costituisce la procedura sperimentale correntemente usata negli studi funzionali con risonanza magnetica, sfrutta le proprietà paramagnetiche della deossiemoglobina, che viene utilizzata come agente di contrasto intravascolare. Lo studio di questo segnale è possibile perché la costante $T2^*$ è fortemente influenzata dalle non uniformità locali del campo magnetico, principalmente dovute alla presenza, nei tessuti, di particelle aventi diversa suscettività magnetica. La deossiemoglobina, comportandosi come una sostanza paramagnetica, provoca forti perturbazioni del campo magnetico locale che vengono registrate dinamicamente attraverso immagini pesate in $T2^*$, associando ad una variazione di segnale RM una

variazione della quantità di deossiemoglobina e, quindi, indirettamente permette di misurare il metabolismo responsabile dell'attivazione neuronale.

Quando un'area cerebrale si attiva, il metabolismo dei neuroni fa sì che vi sia un maggiore richiamo di sangue verso quell'area (figura 2.1.1). Subito dopo lo stimolo di attivazione, l'estrazione dell'ossigeno dai capillari provoca un iniziale aumento della deossiemoglobina, seguito da un aumento del flusso sanguigno, a cui corrisponde un significativo aumento della quantità di ossiemoglobina nei vasi, una riduzione relativa della deossiemoglobina e un conseguente aumento del rapporto ossiemoglobina/deossiemoglobina (figura 2.1.2).

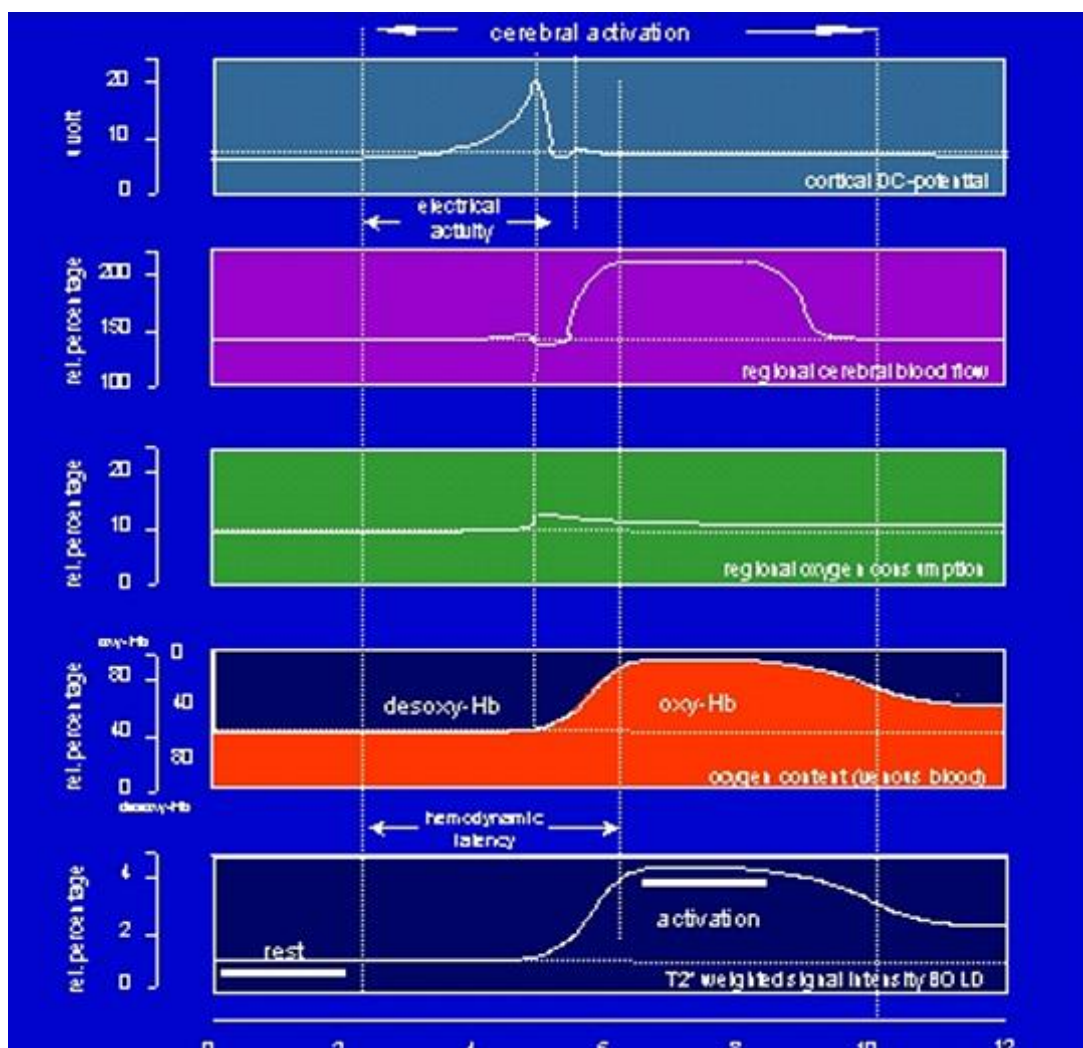


Figura 2.1.1. andamenti temporali dei fenomeni coinvolti nell'effetto BOLD. Partendo dall'alto: andamento del potenziale evocato, flusso regionale cerebrale, consumo regionale di ossigeno, quota di ossiemoglobina contenuta nel sangue, e segnale BOLD risultante pesato in T2*

Poiché la deossiemoglobina è una sostanza paramagnetica, mentre l'ossiemoglobina è diamagnetica, un aumento del rapporto ossi/deossi emoglobina genera un aumento localizzato del segnale RM acquisito con una sequenza pesata in $T2^*$ sensibile agli effetti di suscettività magnetica.

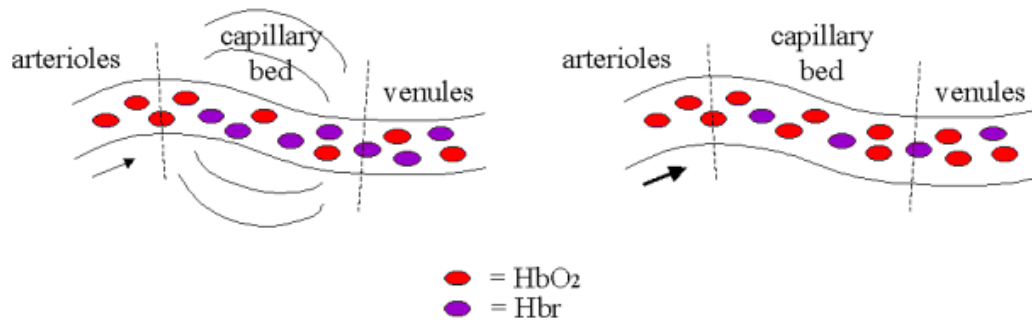


Figura 2.1.2. Schema del principio fisiologico alla base dell'effetto BOLD. In figura viene mostrato l'aumento di ossiemoglobina nei vasi sanguigni in seguito ad una attivazione neuronale.

Il picco di ossiemoglobina viene rilevato dopo 5-6 secondi dallo stimolo di attivazione, in seguito al quale si assiste ad un nuovo significativo aumento della deossiemoglobina, dovuto al consumo di ossigeno dovuto al metabolismo neuronale. Durante questo processo il segnale si riduce fino a raggiungere valori minori di zero, per poi ritornare al valore basale. L'andamento del segnale che descrive questo processo fisiologico alla base dell'effetto BOLD viene generalmente denominato risposta emodinamica (figura 2.1.3).

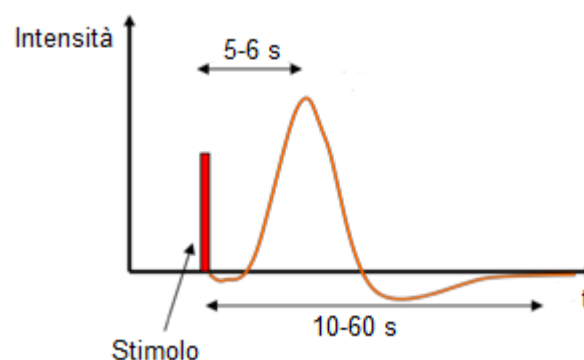


Figura 2.1.3. Andamento della risposta emodinamica in seguito ad uno stimolo

Grazie alle sue potenzialità e al fatto che la sua realizzazione non richiede particolari costi aggiuntivi se già si possiede un tomografo MRI, questa tecnica si è di recente affermata, oltre che in ambito di ricerca anche in ambito clinico. Infatti, può essere utilizzata come metodo di confronto con altre tecniche di acquisizione per valutare

l'estensione, la mancanza o lo spostamento delle attivazioni sia in condizioni normali che patologiche o essere sfruttata come strumento per la valutazione dell'efficacia di eventuali terapie nel tempo, dato che le acquisizioni di fMRI possono essere ripetute più volte sullo stesso soggetto senza controindicazioni.

La tecnica della risonanza funzionale fino ad ora è stata prevalentemente utilizzata per lo studio delle attivazioni cerebrali in risposta ad un compito, necessitando della collaborazione del soggetto che viene sottoposto alla somministrazione di stimoli esterni o a cui è richiesto di eseguire attivamente dei comandi mentali o reali (generalmente relativi al linguaggio o al movimento).

Recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica, chiamata Resting State fMRI (RS-fMRI) che, basandosi sulla conoscenza di un'attività cerebrale di fondo in assenza di particolari stimoli o compiti (task), studia i meccanismi di funzionalità cerebrale a riposo. Questa tecnica non ha l'obiettivo di cercare una attivazione cerebrale specifica in seguito ad un task, ma quello di analizzare la connettività tra le aree del cervello in condizioni di riposo. Anche in condizione di relax completo, infatti, i neuroni hanno una attività spontanea a cui corrisponde un segnale, caratterizzato da un'oscillazione a frequenza minore di 0.1 Hz, cioè molto più bassa di quella che viene generalmente presa in considerazione nello studio dei segnali task-attivi. La scoperta di questi segnali RS è avvenuta tramite l'osservazione del segnale non neuronale, che negli studi task-attivi viene considerato rumore. Parte del rumore, infatti, non può essere ricondotto ad un rumore bianco né eliminato tramite l'applicazione di un filtro passa basso gaussiano, ma può essere considerato un segnale con una organizzazione periodica ben precisa e con frequenza stabile. Questi segnali, che sono presenti anche al di fuori della semplice condizione di riposo, sono caratterizzati da una ampiezza paragonabile a quella dei segnali task-attivi.

Inoltre risultano facilmente misurabili su soggetti anche patologici e non collaboranti poiché persistono oltre che nello stato di veglia, anche durante il sonno, che sia esso spontaneo o indotto come nel caso dell'anestesia o del coma [Fox, 2007].

La registrazione del segnale BOLD spontaneo sull'intero encefalo ha permesso di osservare che regioni con funzionalità simile sono caratterizzate da coerenza ed alta correlazione nell'attività, mentre regioni con funzioni antagoniste (ad esempio aree legate a processi di introspezione e aree legate all'esecuzione di task) sono caratterizzate

da una correlazione negativa dei segnali. La topografia funzionale dell'encefalo può quindi essere descritta tramite l'analisi dei pattern di correlazione tra i segnali RS appartenenti alle diverse aree cerebrali, permettendo di comprendere i processi di elaborazione cerebrale di un segnale ed eventualmente arrivare a predire la risposta ad un certo stimolo. Le correlazioni dei segnali BOLD in RS, infatti, rispecchiano gli schemi funzionali che sono stati memorizzati tramite l'esperienza e l'esecuzione di processi task dipendenti e che sono altamente correlati con le connessioni anatomiche [Fox, 2007].

Diverse metodologie di analisi del segnale BOLD sono state sviluppate ed applicate per l'analisi della RS-fMRI, in modo da permettere lo studio delle reti relative alle funzioni cerebrali di base e di più alto livello.

Tra queste le quattro più utilizzate sono: l'analisi di correlazione tramite seed (Seed Correlation Analysis, SCA), l'analisi delle componenti indipendenti (Independent Component Analysis, ICA), l'analisi dei grafi (Graph Theory, GT) e l'analisi tramite causalità di Granger (Granger Causality analysis, GCA).

Nel primo metodo, SCA [Biswal et al. 1995; Vincent et al. 2006], viene calcolata la correlazione dei segnali RM di tutti i voxel dell'immagine con quello del segnale relativo ad una regione di seed. La scelta dei seed presuppone delle ipotesi a priori sulle aree che possono fungere da generatori della rete di connettività, ovvero che saranno sicuramente coinvolte nel processo che si vuole andare ad analizzare.

Il metodo ICA [Beckmann, 2004; Beckmann, 2005] permette di ottenere pattern di aree appartenenti a network funzionali, ma in maniera automatica, tramite l'individuazione delle componenti indipendenti che compongono il segnale BOLD di tutti i voxel cerebrali. Questo metodo, molto diffuso, permette di separare automaticamente le componenti di rumore e le diverse reti, ma è strettamente dipendente dal numero di componenti indipendenti che vogliono essere prese in considerazione (parametro che deve essere definito a priori) e presuppone una conoscenza delle reti perché possano essere riconosciute.

La GT [Wang, 2010; He, 2010], si basa invece sulla modellizzazione della connettività cerebrale sotto forma di grafi, i cui nodi sono localizzati nelle regioni di interesse dell'encefalo. A partire da questa modellizzazione e da calcoli preliminari di

connettività, vengono definiti degli indici che descrivono ad esempio l'organizzazione della rete, l'importanza di un determinato nodo, la lunghezza e l'efficienza delle connessioni. In questo modo si vogliono andare a valutare da un punto di vista quantitativo la consistenza della rete e la sua connettività.

La GCA [Roebroeck, 2005; Liao, 2011], infine, permette un'analisi più raffinata e quantitativa del segnale, normalmente utilizzata per la valutazione della connettività effettiva. Tramite l'utilizzo di analisi in frequenza e il calcolo di indici, la causalità di Granger permette di individuare le relazioni causali tra i segnali, definendo quindi se vi sia una predominanza nella direzione di una connessione e definendo il flusso del movimento dell'informazione all'interno della rete neurale.

La grande versatilità dei metodi utilizzati per l'analisi del segnale ha permesso un grande sviluppo della tecnica di RS-fMRI e l'applicazione in numerosi campi nell'ambito delle neuroscienze. Inizialmente la tecnica è stata utilizzata per individuare le reti collegate alle funzionalità basilari relative all'apparato motorio, visivo e uditivo in popolazioni di adulti sani. I risultati ottenuti hanno spinto verso lo studio di funzionalità di più alto livello che spesso sono difficili da individuare attraverso studi task-attivi, focalizzandosi sullo studio della Default Mode Network (DMN). Essa è una rete costituita da regioni cerebrali che esibiscono un comportamento opposto rispetto a quello osservato nelle regioni legate all'esecuzione di un compito, ovvero una maggiore attivazione in stato di riposo e una forte deattivazione durante l'esecuzione di compiti [Greicius, 2003]. Queste regioni risultano essere funzionalmente connesse tra loro, ma apparentemente distinte rispetto agli altri sistemi funzionali descritti dalle reti cerebrali e per questo motivo possono essere considerate come il nucleo funzionale in cui risiede il sistema preposto alla cognizione spontanea [Buckner, 2008]. Queste funzionalità di cognizione spontanea associate alla DMN vengono generalmente utilizzate per descrivere funzioni astratte e personali, come il monitoraggio dell'ambiente esterno, che si rispecchia in uno stato esploratorio in assenza di focalizzazione, di meditazione interna, con pensieri riflessivi, introspettivi e giudizi riguardo alla coscienza del sé e infine di elaborazione di pensieri in un tempo diverso dal presente, come la memoria di azioni avvenute nel passato o l'immaginazione del futuro. La rete DMN, apparentemente legata a funzionalità non materiali e con un alto livello di complessità cognitiva, è risultata avere un pattern molto definito che però viene alterato in maniera significativa in numerose patologie neurologiche, aprendo un interessante scenario

riguardo all'utilizzo della tecnica di RS-fMRI nella descrizione di patologie quali l'autismo, l'Alzheimer, il Parkinson, la Sclerosi Multipla, l'epilessia e la schizofrenia [Craddock, 2009; Rosazza, 2011; Koch, 2012].

2.1.2 La RS-fMRI negli studi pediatrici

La tecnica del Resting State, come precedentemente descritto, non è legata alla esecuzione di un task e non necessita di collaborazione attiva da parte del soggetto, di conseguenza questa caratteristica la rende particolarmente adatta ad essere utilizzata in soggetti non collaboranti, quali soggetti patologici non coscienti, pazienti sedati o bambini. In particolare, l'utilizzo della RS-fMRI in ambito pediatrico è di grande impatto perché, correlando le informazioni di funzionalità a quelle strutturali, permette di monitorare gli effetti di degenerazione/disfunzionalità legata a determinati stati patologici. Inoltre, permette di seguire le modifiche dell'organizzazione funzionale dell'encefalo parallelamente ai cambiamenti anatomici, acquisendo informazioni complementari per seguire i processi di sviluppo e maturazione. Come già ampiamente riconosciuto dal punto di vista morfologico, anche dal punto di vista funzionale infatti è stato dimostrato che vi sia una differenza tra le aree a connettività predominante negli adulti (relative alla corteccia associativa) e nei bambini (dove prevalgono le regioni relative a funzioni sensori-motorie primarie) e come nel percorso di sviluppo vi sia un passaggio di centralità dalle aree primarie a quelle di più alto livello [Fransson, 2011]. Tramite l'ausilio di tecniche di analisi dei grafi è stato riconosciuto un pattern di crescita cerebrale che mette in relazione l'anatomia e la funzionalità. Nei primi due anni di vita si assiste, infatti, ad uno sviluppo anatomico caratterizzato da un aumento della densità delle connessioni, ad un aumento del numero di aree coinvolte nelle network e della lunghezza delle connessioni, con una conseguente modifica della posizione delle aree che svolgono un ruolo predominante nel pattern di connettività (ovvero quelle che possiedono il maggior numero di connessioni con le altre aree cerebrali). Parallelamente, in maniera strettamente legata a tali cambiamenti anatomici, si assiste anche a significative variazioni da un punto di vista funzionale, con una modifica locale e globale dei collegamenti tra i nodi e della loro efficienza. In particolare, nel primo anno di vita si osservano connessioni funzionali limitate in due regioni separate, anteriore e posteriore, caratterizzate da connessioni corte e focalizzate intorno ad aree relative a

funzioni primarie (sensori-motoria, uditiva, visiva). Con lo sviluppo, nel secondo anno di vita si osserva un pattern significativamente differente, con cluster a distribuzione più uniforme e centralizzata, connessioni a lunghezza maggiore (legate alla mielinizzazione della materia bianca) e focalizzazione su aree funzionali cognitive. Negli anni seguenti, il pattern di connettività cerebrale viene caratterizzato da modifiche topologiche più localizzate, in cui si assiste ad un potenziamento della specializzazione funzionale delle singole regioni cerebrali [Power, 2010; Fransson, 2011; Gao, 2011].

Risultati che descrivono lo stesso andamento nel tempo dello sviluppo cerebrale sono stati raggiunti anche tramite l'utilizzo di differenti tecniche di analisi RS, come ICA e SCA. In particolare, alcuni studi hanno analizzato la coerenza dei segnali che formano le reti cerebrali nei neonati e la loro evoluzione in relazione all'età, attraverso l'utilizzo di tecniche ICA. Tra questi risultano di particolare interesse due studi condotti da Fransson. Nel primo [Fransson, 2007], è stata effettuata un'analisi in gruppo di neonati prematuri nei quali sono stati individuati pattern relativi al network visivo, somato-sensoriale ed uditivo del tutto simili a quelli riscontrati negli adulti. Inoltre sono state individuate forme prototipali del DMN, separato in due componenti anteriore e posteriore, mostrando l'assenza di connessione antero-posteriore. La stessa tecnica ICA è poi stata utilizzata su una popolazione di neonati nati a termine [Fransson, 2009]. In particolare, sono stati confermati i risultati riscontrati nei prematuri con l'individuazione delle network di base (somato-sensoriale, visiva, uditiva) e di alcuni pattern riconducibili a due network separate, una anteriore e una posteriore, precursori del DMN. In aggiunta è stata individuata una rete composta dai gangli della base che non era presente nei pretermine. Uno studio condotto da Wylie [Wylie, 2014] ha invece messo in relazione le network trovate nei neonati e negli adulti ed è stato possibile individuare ulteriori componenti di network funzionali di alto livello. Nei neonati, oltre alle reti precedentemente descritte (sensori motorie, uditive, visive, componenti anteriore e posteriore del DMN), sono stati individuati dei pattern di coerenza tra aree che indicano la formazione di altre tre reti funzionali di alto livello: cervelletto, salienza ed esecutiva. Queste conformazioni, sebbene lontane dalla configurazione finale dell'età adulta, suggeriscono che le reti di alto livello siano già presenti in forma prototipale, ma si svilupperanno più tardi acquisendo una maggiore specializzazione. Tali risultati riguardanti le network di alto livello funzionale, sono confermati in uno studio longitudinale condotto da Damaraju [Damaraju, 2014] in soggetti tra i 4 e i 9 mesi di età

in cui vengono individuate la maggioranza delle 10 reti che caratterizzano l'encefalo adulto, in relazione a funzioni basilari e complesse. Lo studio temporale di queste reti ha permesso di verificare come durante questi mesi si modifichino sia la conformazione, che si avvicina a quella dell'adulto, sia la connettività. Nel passaggio dai 4 ai 9 mesi infatti essa risulta diminuire all'interno delle singole network (ad eccezione della DMN in cui ha un andamento opposto), mentre aumenta la connettività tra le differenti reti. Viene così descritta una maggiore efficienza delle connessioni più brevi, che quindi necessitano di un numero minore di circuiti neuronali, e lo sviluppo delle connessioni a lungo raggio. Lo studio di un intervallo di tempo maggiore 0-1-2 anni, condotto da Gao [Gao, 2015], ha permesso di mettere a fuoco ulteriori modificazioni che caratterizzano le reti cerebrali. Alle diverse età Gao ha considerato quali network avessero una conformazione finita, come quella che si ritrova negli adulti. Nei neonati sono state individuate solo due network, la visiva e la sensori-motoria, mentre la uditiva è presente in due componenti separate nei due emisferi. Nel primo anno di età sono invece riconosciute, in forma più o meno avanzata, 9 delle 10 reti presenti negli adulti comprese quelle di alto livello funzionale: uditiva, visiva, motoria, somato-sensoriale, DMN, salienza, latero-parietale, frontopolare e occipitale. Queste network, che presentano caratteristiche di lateralizzazione o suddivise in due componenti anteriore e posteriore, hanno un accrescimento di connettività di tipo logaritmico, cioè le modificazioni appaiono significative e veloci durante il primo anno di età, per poi seguire un andamento più lento nel secondo anno, dove avvengono le rifiniture delle configurazioni.

Risultati simili, relativamente allo sviluppo delle network, sono stati ottenuti da Lin utilizzando la tecnica SCA su una popolazione di bambini di età compresa tra gli 0 e i 2 anni [Lin, 2008]. In questo caso, sono state prese in considerazione 6 aree di seed localizzate bilateralmente nelle aree motorie, sensoriali e visive. Il pattern di connettività risultante mostra come la correlazione tra le aree appartenenti alle singole network aumenta con l'età, ma che la rete sensori-motoria e la visiva hanno tempistiche di accrescimento differenti. Infatti, il volume di materia grigia corticale correlata con il seed, nella network sensori-motoria aumenta sensibilmente nel primo anno, mentre rimane stabile tra il primo e il secondo anno di età. Al contrario la rete visiva rimane stabile durante il primo anno e si osserva un aumento significativo del volume durante il secondo anno di età. Altri due studi SCA di Doria [Doria, 2010] e Smyser [Smyser,

2010] si sono focalizzati sulle network nei neonati a termine e pretermine (acquisiti in entrambi i lavori a 30 SG, 33 SG, 40 SG) ottenendo risultati equivalenti. In entrambi i casi sono stati posti seed inizialmente nelle aree visive, uditive, somato-sensoriali, motorie, parietali, nella corteccia cingolata posteriore, anteriore e prefrontale media, nel cervelletto e nel talamo. A partire da questi seed sono state ricavate le mappe di correlazione relative alle rispettive network, comprese network di alto livello come il DMN, la rete frontoparietale e quella attentiva. Nel lavoro di Doria, reti corrispondenti a quelle ricavate tramite SCA, sono state individuate anche tramite una analisi ICA di confronto effettuata sugli stessi campioni [Doria, 2010]. Dall'analisi longitudinale effettuata dal gruppo di Smyser [Smyser, 2010], è stato riscontrato come i seed mediali e quelli sensori-motori siano in grado di generare connessioni bilateralmente nei due emisferi fin dalla 26 SG, mentre seed più laterali sviluppano correlazione con la rispettiva controparte nell'emisfero opposto tra la 34-38 SG. In generale, intorno alla 40 SG si osserva una convergenza verso il pattern delle reti nell'adulto, con un'area di correlazione che, inizialmente estesa su un volume comprendente la corteccia primaria, secondaria e le zone sottocorticali, diminuisce focalizzandosi sulle sole regioni corticali. Le network con l'aumento dell'età sono quindi caratterizzate sia da una maggiore correlazione che da una maggiore organizzazione. È inoltre stata riscontrata una differenza tra le network dei neonati a termine e quelli pretermine, in particolare nella connettività con il talamo: mentre nei pretermine la correlazione è frammentata e largamente distribuita, nei nati a termine si osserva una più alta correlazione con una particolare focalizzazione sulle aree motorie [Smyser, 2010].

Come è possibile evincere dai risultati ottenuti in questi studi, la RS-fMRI fornisce informazioni complementari utili a confermare il processo di sviluppo anatomico, dove la maturazione della materia grigia e la maggiore specializzazione delle aree corticali si traducono in una focalizzazione delle correlazioni, e dove la mielinizzazione della materia bianca si traduce nella formazione di connessioni anatomiche e funzionali anche tra aree lontane tra loro.

Come mostrato, alcuni gruppi hanno quindi deciso di focalizzare la loro attività di ricerca nell'ambito della RS- fMRI allo studio dei bambini nati prematuri [Fransson, 2007; Smyser, 2010; Doria, 2010], in modo da fornire utili informazioni riguardo ai processi funzionali, al loro sviluppo e ai fattori che possono influenzarli ed essere in

grado di descrivere in maniera più accurata la complessità dello sviluppo in condizioni di nascita non convenzionale.

Per lo studio dello sviluppo cerebrale, i bambini prematuri costituiscono un gruppo di grande interesse, in particolare quando, non mostrando conseguenze patologiche apparenti dovuti alla nascita prematura, possono essere considerati normali. Infatti, la prematurità permette di studiare in vivo alcuni step evolutivi che normalmente avvengono in utero e che, dunque, sono difficili da seguire con precisione. E' tuttavia innegabile che la nascita prematura possa far insorgere delle problematiche conseguenti al fatto di avvenire all'improvviso e in una condizione in cui il feto non ha ancora raggiunto una maturità sufficiente per sopportare la vita extra uterina.

Anche in assenza di condizioni patologiche causate dalla nascita prematura, lo sviluppo cerebrale in questa categoria di soggetti è però di particolare interesse per comprendere se l'interruzione improvvisa del processo di sviluppo fetale abbia un'influenza particolare sulle fasi di maturazione anatomica e funzionale. Nella maggior parte dei casi infatti, una nascita prematura accade durante la fase di veloce sviluppo del substrato corticale, determinante per la formazione dei fasci talamo-corticali, o prima della maturazione dei fasci di materia bianca che svolgono un ruolo nell'adempimento delle funzioni innate basilari che permettono la sopravvivenza di un soggetto. È inoltre noto che bambini nati prematuri abbiano più alta probabilità di sviluppare lesioni cerebrali o problematiche neurologiche di varia entità, ritardi nella acquisizione di fasi di sviluppo cognitivo, problemi legati alla affettività, alla socializzazione o disturbi nell'apprendimento.

In aggiunta, la tecnica di RS-fMRI è particolarmente adatta ad analisi multimodali, in unione con altre tecniche (RM anatomica, DTI, fMRI task-attiva, EEG), per fornire dati funzionali utili alla comprensione del funzionamento cerebrale. Ad esempio, risultati interessanti sono stati trovati in uno studio multimodale di segnali fMRI-EEG, acquisiti su neonati e adulti nati pretermine [Fransson, 2013]. È stato mostrato che nei neonati vi sia una correlazione tra i pattern di connettività delle dinamiche del segnale spontaneo acquisito tramite fMRI e l'architettura neuronale della corteccia sensitiva primaria e della corteccia associativa. E' stata poi riscontrata una consistenza tra gli schemi spaziali definiti tramite fMRI nella corteccia occipitale e parietale e gli stessi individuati attraverso misurazioni EEG, nonostante la risoluzione spaziale fosse molto inferiore.

Infine, una analisi integrata di dati DTI e RS-fMRI [Van den Heuvel, 2014] in una popolazione tra la 30 e la 40 SG, ha permesso di individuare ancora in età pretermine un'organizzazione modulare di tipo small-world. Un'analisi di connettività funzionale ha mostrato la presenza delle reti, anche se in alcuni casi in fase di immaturità, rivelando una forte sovrapposizione con l'architettura riscontrata nell'adulto sia per quanto riguarda l'analisi strutturale di DTI (85% di sovrapposizione) che quella funzionale di RS-fMRI (81% sovrapposizione). Questa analisi longitudinale tra la 30 e la 40 SG ha permesso di mettere in luce le modifiche che intercorrono sia nell'architettura delle reti, in particolare nella struttura della WM e nella topologia small-world, sia nella connettività funzionale interemisferica, rivelando anche un incremento nella capacità di integrazione tra le network.

I nostri lavori di RS-fMRI che sono presentati in questo capitolo si inseriscono nell'ambito dello studio della connettività funzionale nei bambini prematuri e si focalizzano sullo studio delle reti di base e della DMN.

Per effettuare una analisi il più possibile ottimizzata sui dati a nostra disposizione, è stato generato un atlante basato sulle immagini anatomiche del nostro campione. Questo ha permesso di effettuare una normalizzazione più corretta di tutte le immagini dei soggetti, di mantenere la variabilità del campione e di limitare deformazioni che introducono modifiche nel segnale funzionale utilizzato per lo studio della connettività.

Attraverso l'utilizzo di tecniche SCA, siamo andati a valutare lo sviluppo delle reti di basso livello (motoria, visiva e uditiva) e le due componenti anteriore e posteriore della DMN nell'intervallo di età della popolazione dei prematuri per analizzare la progressione delle correlazioni tra le aree cerebrali. In particolare, oltre alle correlazioni positive sono valutate le correlazioni negative, che raramente vengono prese in considerazione negli studi di resting state, ma possono fornire informazioni interessanti per descrivere le modifiche che avvengono in fase di sviluppo. Gli studi effettuati dagli altri gruppi già descritti sopra hanno sottolineato come le reti legate a funzionalità complesse, come quelle cognitive, attentive, di linguaggio, siano già presenti anche nei bambini prematuri in forma prototipale e non specializzata. Non sono state però valutate le connessioni fra le diverse network e il loro sviluppo nel corso del tempo.

Il nostro lavoro si è proposto quindi di analizzare approfonditamente le cross-correlazioni tra le aree appartenenti alle diverse reti, in modo da valutare la presenza e la modifica della interconnessione tra le diverse funzionalità, in relazione all'età e a differenti parametri demografici che caratterizzano i singoli soggetti.

2.2. Studio delle reti cerebrali in neonati prematuri tramite RS-fMRI

2.2.1. Materiali e Metodi

Partecipanti e protocollo di acquisizione

In questo studio sono stati inclusi 15 neonati prematuri (6 femmine e 9 maschi), con età mediana alla nascita di 31^{+6} settimane gestazionali (SG) distribuite nell'intervallo 27^{+4} –34 settimane. Al momento dell'esame RM l'età mediana del gruppo era di 35 SG, con i singoli soggetti compresi tra le 33 e le 38 SG. I neonati sono stati reclutati tra tutti i pretermine sottoposti ad un esame clinico RM di controllo richiesto dalla unità di neonatologia del nostro Ospedale. Sono stati inclusi solo neonati con età gestazionale alla nascita e allo scan rispettivamente non superiori a 37 SG e 38 SG (caratteristiche in tabella 2.1) che presentassero un encefalo entro i limiti di normalità e per cui, alla valutazione da parte di un neuroradiologo pediatrico, fosse possibile escludere patologie neurologiche: infezioni congenite, sindrome da anomalie congenite multiple, lesioni parenchimali intra-cerebrali, idrocefalo, malformazioni encefaliche congenite, disordini metabolici, emorragie intraventricolari, iperintensità puntuali nella WM in T1, leucomalacia periventricolare.

L'acquisizione delle immagini è stata condotta durante il sonno spontaneo del neonato senza alcun tipo di sedazione farmacologica e la condizione del bambino è stata monitorata da un neonatologo per tutta la durata della scansione, anche con l'aiuto di un pulsossimetro. Per essere in grado di effettuare l'acquisizione in queste condizioni l'ambiente è stato preparato e mantenuto caldo, tranquillo e buio in modo da ottimizzare il comfort dei neonati durante tutto l'esame.

L'esame RM è stato effettuato su uno scanner 1.5 T Philips Intera (Philips Medical Systems S.p.A., Eindhoven, The Netherlands). Il protocollo di acquisizione è stato suddiviso in una prima parte dedicata alla valutazione clinica del paziente, mentre la seconda è stata dedicata all'acquisizione delle sequenze specifiche di RS fMRI. L'indagine clinica ha incluso l'acquisizione di immagini anatomiche assiali e coronali pesate in T2 (TSE, TR=6244 ms, TE=150 ms, flip angle=90°,FOV= 160x140, voxel size=0.7x0.87x4 mm) e immagini assiali e sagittali pesate in T1 (SE-MS, TR=524 ms, TE=15 ms, flip angle=90°,FOV= 170x150, voxel size=0.85x1.7x3 mm). Per l'analisi

del RS sono state acquisite due sessioni da 70 scan ciascuna, senza alcun tipo di stimolazione esterna (EPI-GE, TR=2500 ms, TE=29 ms, flip angle=90°,FOV= 180x180, voxel size= 2.25x2.25x3 mm, # sezioni=30).

Soggetti	Genere	SG nascita	SG esame	<35/ >35 SG
1	M	30+3	34	1
2	F	31+3	34	1
3	M	31+3	35	-
4	M	36+5	38	2
5	F	31+5	34	1
6	M	27+6	35	-
7	M	31+6	35	-
8	F	31+6	35	-
9	F	32+5	36	2
10	F	32+5	35	-
11	M	33+6	37	2
12	M	33	35	-
13	M	31+4	36	2
14	F	34	38	2
15	M	29	33	1

Tabella 2.1 Caratteristiche dei soggetti

Pre-processing delle immagini

Il pre-processing è stato suddiviso in differenti step di analisi eseguiti utilizzando SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/>). Il primo passaggio è consistito nel riorientamento e nel reset dell'origine delle immagini, in modo che fossero tutte centrate sulla commissura anteriore e allineate agli assi del FOV e alla linea AC-PC che unisce commissura anteriore e posteriore. In seguito, è stato effettuato il riallineamento degli scan funzionali di entrambe le sessioni alla immagine funzionale media per la correzione di eventuali movimenti durante le acquisizioni. I valori del movimento stimati durante questo passaggio sono stati analizzati ed è stata valutata la presenza di scan con traslazioni maggiori di 2 mm e rotazioni maggiori di 2° rispetto ad uno dei tre assi. Volumi caratterizzati da movimenti di questo tipo si trovano generalmente all'inizio o al termine della sessione e sono quindi stati eliminati insieme a quelli precedenti (se all'inizio della sequenza) o a quelli seguenti (se alla fine), in modo da non modificare le caratteristiche in frequenza del segnale BOLD. Il passaggio è poi stato nuovamente ripetuto dopo l'eliminazione di tali scan, per ottenere un

riallineamento più accurato. Il passaggio successivo è stato quello della normalizzazione ad un sistema di riferimento comune per tutti i soggetti. Il processo di normalizzazione delle immagini è stato suddiviso in due step: inizialmente l'immagine T2 assiale, che descrive l'anatomia del soggetto, è stata coregistrata alla immagine funzionale media ed successivamente l'anatomica e gli scan funzionali sono stati normalizzati ad un atlante anatomico di riferimento [Kuliskova-Murgasova, 2011] generato da un campione di neonati prematuri alla 35 SG. Dopo la normalizzazione, le immagini funzionali sono state sottoposte ad uno smoothing spaziale tramite un kernel gaussiano di ampiezza a mezza altezza (full width at half maximum, FWHM) pari a 6 mm. L'ultimo passaggio ha riguardato la segmentazione delle immagini anatomiche, mediante l'utilizzo di mappe di probabilità di WM, GM e CSF appartenenti ad un atlante specifico relativo ad una popolazione di neonati di 35 SG [Kuliskova-Murgasova, 2011].

Analisi delle reti di connettività funzionale

1) Pre-processing del segnale BOLD

L'elaborazione delle immagini di RS fMRI per lo studio della connettività funzionale è stata effettuata mediante REST toolbox [Song, 2011]. Un primo passaggio ha riguardato il pre-processing delle immagini fMRI dei singoli soggetti. I segnali BOLD relativi ad ogni voxel dell'immagine funzionale sono stati corretti tramite una regressione lineare per le variabili considerate rumore, come il segnale medio dell'intero encefalo (segnale globale), i segnali medi di materia bianca e CSF ed i parametri di movimento stimati durante il passaggio di riallineamento degli scan funzionali [Van Dijk, 2010] eseguito, come detto prima, mediante SPM8. In seguito, è stata stimata e corretta la linea di tendenza dei dati (processo di detrend) ed è stato applicato un filtro passa banda sulle frequenze di interesse per lo studio delle oscillazioni RS, corrispondenti all'intervallo 0.01-0.08 Hz. Questo range infatti corrisponde a quello in cui generalmente vengono individuati i segnali RS.

2) Seed Correlation Analysis (SCA)

Utilizzando le immagini contenenti i segnali BOLD corretti e filtrati, sono state identificate le Resting State Networks (RSN), tramite la tecnica di SCA. A partire dalle regioni di seed, che vengono descritte come le regioni cerebrali da cui la rete si propaga e sviluppa, è stata calcolata la correlazione di Pearson con tutti i voxel dell'immagine in modo da generare delle mappe di connettività funzionale dell'encefalo all'interno di una specifica network. A questo scopo sono stati definiti, 8 seed sferici di raggio 3-5 mm

per lo studio di quattro RSN (figura 2). Le coordinate di tali seed sono state localizzate sul nostro template anatomico neonatale individuando aree corrispondenti a quelle utilizzate in letteratura per lo studio delle stesse network negli adulti [Van Dijk, 2010]. La prima rete analizzata è la Default Mode Network (DMN), che è legata a funzionalità di alto livello e completa il suo sviluppo verso l'età adulta. Partendo dal presupposto che nei neonati questa network non sia ancora completamente costituita [Fransson 2007; Fransson 2009], in questo lavoro è stata suddivisa in due componenti, una anteriore e una posteriore e i rispettivi seed sono stati posizionati, per la DMN anteriore (aDMN) bilateralmente nelle corteccie prefrontali medial (mPFC), per la DMN posteriore (pDMN) nella corteccia cingolata posteriore (pCC) e nella corteccia laterale parietale (LatPar) bilateralmente. Inoltre sono state prese in considerazione RSN relative a funzioni più basilari, generalmente già sviluppate nei neonati, come quella motoria, visiva e uditiva. Per la RSN motoria (MotN) i seed sono stati localizzati bilateralmente nella corteccia motoria primaria, per la RSN uditiva (AudN) i seed sono stati localizzati bilateralmente nelle corteccie uditive profonde e corticali, per la RSN visiva (VisN) i seed sono stati posizionati bilateralmente nelle corteccie visive primarie profonde e corticali (figura 2.2.1).

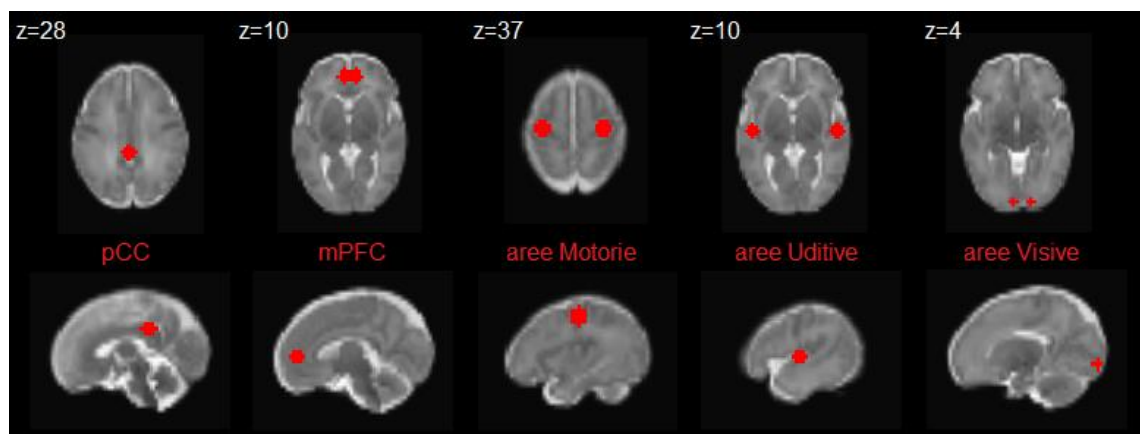


Figura 2.2.1. Seed delle RSN

3) Seed Correlation analysis di gruppo

a. Le mappe di correlazione generate dei singoli soggetti sono state mediate sull'intero gruppo e su due sotto gruppi: *G1* comprendente i neonati con età all'esame inferiore a 35 SG e *G2* comprendente i neonati con età all'esame maggiore di 35 SG. Il gruppo *G1* comprende 4 neonati, con età mediana 34 SG ed età tra le 33 e le 34 SG. Il gruppo *G2* comprende 5 neonati, con età mediana 37 SG ed età tra le 36 e le 38 SG. I rimanenti 6

soggetti di età allo scan pari 35 SG in questa fase non sono stati inseriti in alcun sottogruppo.

Questa suddivisione ha permesso di generare tre mappe di correlazione medie per ognuno dei tre gruppi e di seguire lo studio della differente organizzazione cerebrale durante il periodo pre termine.

b. Un'analisi di gruppo specifica per la DMN sull'intero campione è stata effettuata applicando una trasformata Z di Fisher alle mappe di correlazione. L'effetto di gruppo è stato valutato tramite un one-sample t-test e sono state definite le correlazioni positive e negative significative a $p < 0.05$ correggendo per FWE.

4) Matrici di cross-correlazione

Le mappe medie dell'intero gruppo, di *G1* e di *G2* sono state sottoposte a sogliatura per ottenere cluster di voxel caratterizzati da valori di correlazione $r > 0.8$ che corrispondono ad aree anatomiche appartenenti alle RSN (aree-RSN). Per tutti i soggetti sono state estratte le serie temporali medie di ognuna di queste aree-RSN, poi normalizzate sottraendo il loro valore medio e dividendo punto a punto per la deviazione standard [Ding M., 2000]. Questo passaggio di normalizzazione è stato introdotto per ottenere dei segnali che mantenessero le variazioni inter-soggetto, ma che allo stesso tempo potessero essere considerati come segnali appartenenti ad acquisizioni multiple effettuate sullo stesso soggetto. I segnali normalizzati dei soggetti sono stati concatenati tra loro in modo da generare dei segnali di gruppo per l'intero campione, per *G1* e per *G2*.

Infine, è stata calcolata la cross-correlazione tra tutte le aree-RSN nei tre gruppi (intero, *G1* e *G2*) e sono state generate delle matrici di cross-correlazione.

5) Effetto dell'età nella DMN

L'effetto indotto dall'età nel DMN in fase di sviluppo è stato valutato tramite un two-sample t-test (unc., $p < 0.001$) sulle mappe di correlazione della DMN sottoposte a trasformazione Z di Fisher e utilizzando le età in SG allo scan come covariate. In questo modo è stato possibile individuare quali sono le aree dove l'età induce cambiamenti significativi sulle mappe di connettività, sia in positivo che in negativo.

6) Correlazione con aree task-positive

All'interno del nostro studio una forte correlazione positiva del DMN con l'età è stata riscontrata in due aree generalmente considerate di alto livello e legate ad una

attivazione indotta dallo svolgimento dei task relativi a funzioni esecutive [Koechlin, 1999; Chai, 2014]: la corteccia dorsolaterale prefrontale (DLPFC) e le aree frontopolari (FP). Dato che queste due aree sono caratterizzate da una maturazione molto tardiva, abbiamo voluto valutare la correlazione dei segnali appartenenti a queste aree con entrambi i seed del DMN per capire se vi siano relazioni funzionali precedenti al completo sviluppo delle connessioni anatomiche.

Da seed sferici centrati in queste due aree (figura 2.2.2) sono state estratte le serie temporali che in seguito sono state sottoposte a cross-correlazione con i segnali dei seed del DMN, generando dei coefficienti di correlazione che chiamiamo r-coeff. I valori di r-coeff sono stati sottoposti ad un test di significatività nel gruppo ed un t-test a due code ($p < 0.05$) è stato utilizzato per calcolare la correlazione tra i valori di r-coeff e l'età allo scan in modo da valutare la modifica di queste connessioni durante lo sviluppo.

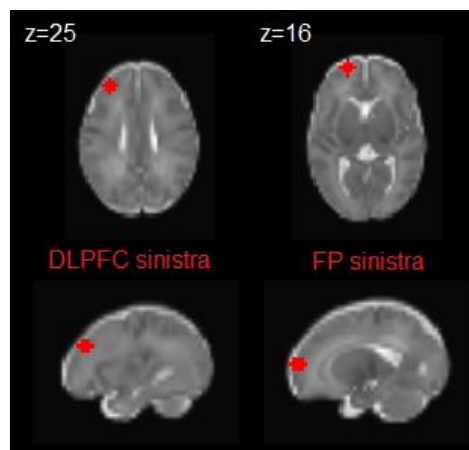


Figura 2.2.2 Immagini delle aree legate allo svolgimento di un task.

2.2.2. Risultati e discussione

Seed correlation analysis di gruppo

Le analisi di SCA sulla popolazione dei prematuri hanno permesso di ottenere le mappe di correlazione per le network cerebrali dell'intero gruppo. In fig. 2.2.1 sono mostrate le correlazioni positive, maggiori di $r > 0.3$, relative alle quattro RSN di nostro interesse: DMN (suddivisa nelle due componenti anteriore, aDMN, e posteriore, pDMN), RSN motoria (MotN), RSN uditiva (AudN), RSN visiva (VisN).

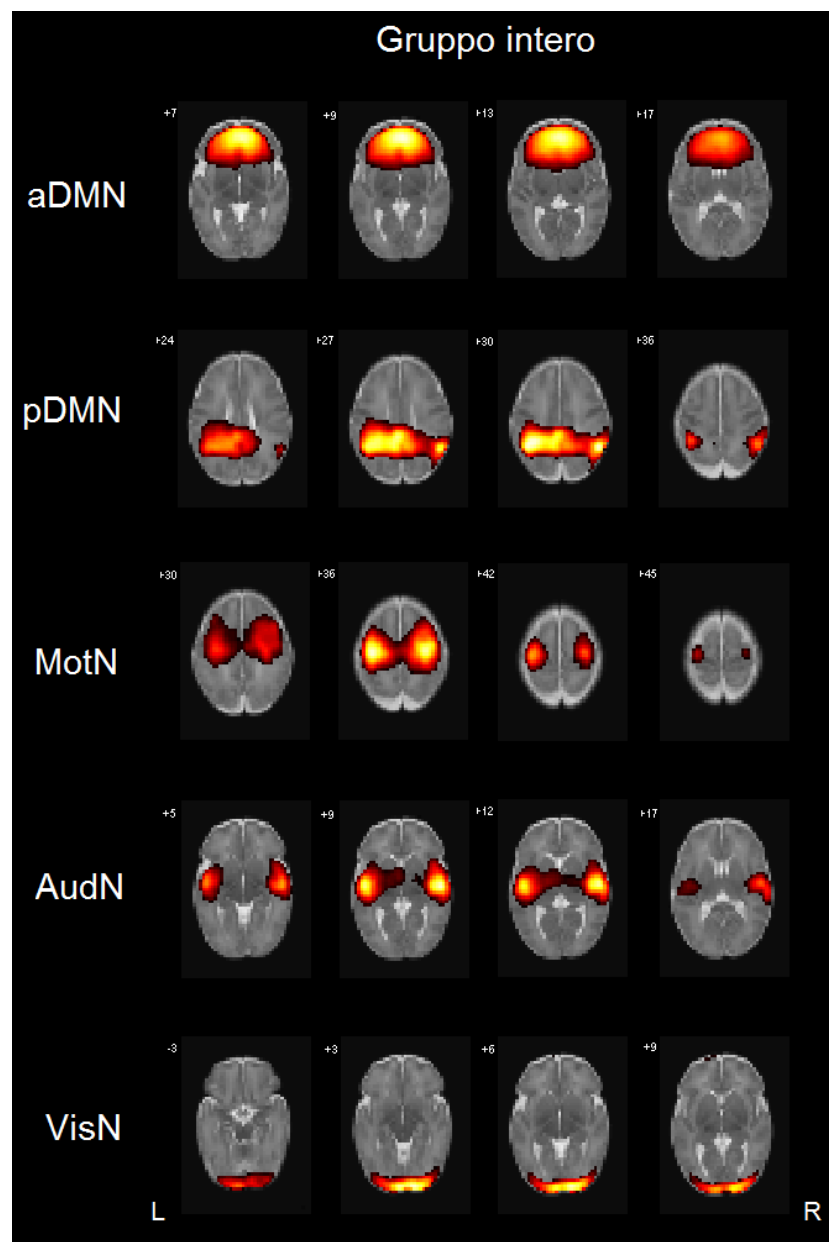


Figura 2.2.4. RSN ottenute da SCA: vengono mostrati i valori per $r > 0.3$. I seed sono stati posizionati in: mPFC per aDMN; pCC + LatPar per pDMN; corteccia motoria per MotN; aree uditive primarie per AudN; aree visive primarie per VisN.

Come è possibile osservare, le correlazioni si sviluppano in aree abbastanza estese e poco focalizzate e raggiungono i valori massimi in corrispondenza dei seed. L'estensione delle correlazioni è significativa nella aDMN, nella pDMN, nella MotN e nella AudN. In particolare, per aDMN si sviluppa simmetricamente nell'intero lobo frontale, mentre per pDMN si sviluppa con una apparente predominanza verso destra dal pCC verso le aree Laterali Parietali (LatPar), che sono caratteristiche del DMN in età adulta e nell'analisi SCA sono state utilizzate insieme a pCC come seed. Interessanti risultano le correlazioni in posizione mediale della MotN e della AudN. Nei prematuri, Smyser [Smyser, 2010] ha riscontrato la presenza di correlazioni mediali solo in corrispondenza di seed mediali, come pCC e mPFC, mentre nel nostro lavoro le correlazioni significative vengono trovate anche in corrispondenza di seed posizionati in aree laterali. Di particolare interesse risulta il pattern della AudN, dove la presenza di correlazioni che uniscono i due seed bilaterali suggeriscono una forte connessione bilaterale fra i due emisferi.

L'analisi delle mappe medie di correlazione dei due gruppi *G1* e *G2* ha permesso invece di analizzare le differenze dei pattern nei prematuri più gravi (< 34 SG allo scan) e in quelli meno gravi (> 36SG allo scan). In generale, come già osservato da Damaraju [Damaraju, 2014], nel passaggio da *G1* a *G2* in tutte le network, ad eccezione della pDMN, è stata osservata una maggiore focalizzazione delle correlazioni col seed. Differenze significative tra *G1*, *G2* e il pattern ottenuto sul gruppo intero, sono state riscontrate in due network, la pDMN e la AudN.

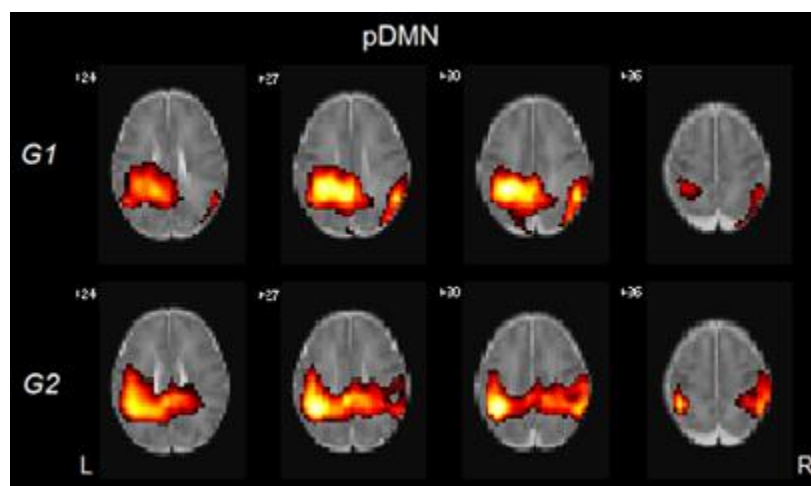


Figura 5.2.2. Differenza pDMN tra *G1* e *G2*

In particolare, il pDMN mostra un andamento opposto rispetto a quello delle altre reti (fig 2.2.2), con un aumento della correlazione all'interno della rete.

Mentre nel gruppo *G1* infatti la correlazione non raggiunge valori particolarmente elevati ed è concentrata intorno all'area pCC, nel gruppo *G2* si osserva un progressivo aumento dei valori di r e una espansione delle correlazioni funzionali verso le LatPar, ad indicare una progressione nello sviluppo di questa network con una maggiore interconnessione tra le aree che la compongono.

La rete uditiva nei due gruppi mostra invece delle differenze riguardanti l'area di correlazione e alla lateralizzazione (fig. 2.2.3). La simmetria e la correlazione nelle aree mediane riscontrate nello studio del gruppo completo, non vengono infatti ritrovate quando i due gruppi vengono studiati separatamente. La correlazione interemisferica viene ritrovata nel gruppo *G1*, dove appare anche una marcata asimmetria della correlazione con una forte predominanza verso destra in cui la correlazione risulta molto più forte e molto più ampia di quella sinistra.

Nel gruppo *G2*, nonostante permanga una più ampia area di correlazione con il seed destro, che tende a seguire il solco temporale superiore, si osserva invece una mancanza di correlazione interemisferica, una maggiore tendenza alla simmetria delle correlazioni ed una maggiore focalizzazione intorno all'area di seed. La presenza di queste correlazioni interemisferiche nelle mappe dell'intero gruppo e di *G1*, suggerisce che le correlazioni si riducano a partire dalla 35 SG.

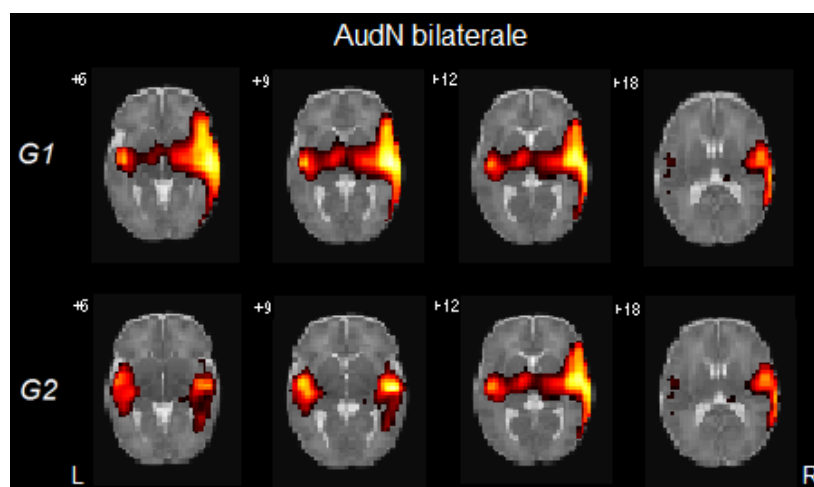


Figura 2.2.6. Confronto G1 e G2 rete AudN con seed bilaterale.

Le differenze della rete AudN in *G1* e *G2* risultano ancora maggiori se si analizzano le reti ottenute utilizzando i singoli seed, destro e sinistro separatamente (fig. 2.2.4). Entrambe le mappe sono caratterizzate da una diminuzione dell'area di correlazione, in particolare nelle zone medialì. Queste correlazioni infatti, risultano ben separate nei due emisferi corrispondenti, descrivendo un pattern di connessione molto forte intraemisferico che si propaga anche verso aree più medialì attraverso una sequenza di connessioni brevi tra aree contigue. Riguardo al comportamento nei due singoli emisferi, dall'analisi delle singole mappe esso risulta significativamente differente. La rete con seed localizzato nell'area uditiva sinistra è caratterizzata da una maggiore focalizzazione della correlazione intorno al seed nel gruppo *G2* rispetto a *G1*. La rete con seed a destra, presenta una maggiore focalizzazione in *G2* rispetto a *G1*, tuttavia si nota sia in *G1* che in *G2* una maggiore estensione della correlazione rispetto all'omologa sinistra.

Durante questa fase di sviluppo, una diminuzione dell'area di correlazione corrisponde ad una maturazione della regione corticale interessata e ad una maggiore specializzazione funzionale delle aree. La focalizzazione del cluster di correlazione intorno al seed descrive quindi un processo maturativo più avanzato e all'acquisizione di una funzionalità specifica.

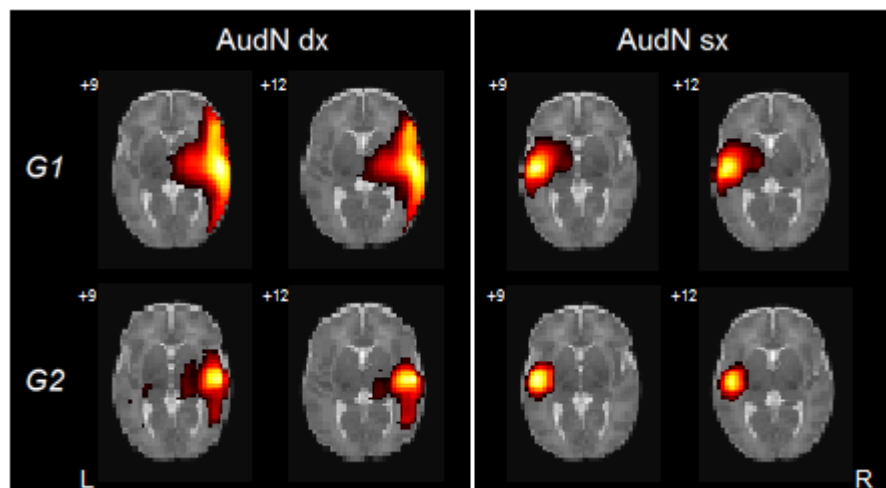


Figura 2.2.7. Confronto delle due reti Aud dx e Aud sx nei due gruppi *G1* e *G2*.

Mentre nel DMN l'aumento della correlazione verso le aree LatPar può indicare lo sviluppo delle connessioni anatomiche verso tali aree e di conseguenza delle connessioni funzionali, nella network uditiva la diminuzione della correlazione indica invece una maggiore specializzazione funzionale delle aree corticali e lo sviluppo di

connessioni a corto raggio più efficienti che necessitano un numero minore di circuiti neuronali [Damaraju, 2014].

In questo specifico ambito l'asimmetria della rete uditiva nei due emisferi può quindi essere legata al processo di sviluppo del circuito uditivo e del linguaggio. Esso si sviluppa in tre fasi durante le quali si assiste prima ad una maggiore maturazione della corteccia sinistra durante il periodo pre-termine [Dehaene-Lambertz, 2005; Dehaene-Lambertz, 2006], poi, intorno alla 40 SG, ad una simmetria della maturazione funzionale dovuta allo sviluppo di connessioni anatomiche interemisferiche, infine ad una nuova lateralizzazione del circuito del linguaggio legata alla esposizione del neonato a stimoli esterni. Questo processo di lateralizzazione, che procede fino all'adolescenza [Brauer, 2008; Friederici, 2011; Holland, 2007; Perani, 2011], si riflette nelle connessioni funzionali e può essere utilizzato per spiegare i risultati da noi ottenuti. La correlazione minore nell'emisfero sinistro in *G1* riflette il processo di maturazione più avanzato nella corteccia sinistra nel periodo pre-termine, legato alla innata lateralizzazione funzionale. L'aumento della simmetria in *G2* può invece essere ricondotto all'aumento delle connessioni interemisferiche che permettono una maggiore simmetria funzionale dei circuiti uditivi e di linguaggio. Questi risultati sono consistenti con quelli ottenuti in una popolazione pretermine in uno studio di attivazione funzionale a stimoli linguistici condotto dal nostro gruppo [Baldoli, 2014], dove intorno alla 33 SG l'attivazione uditiva veniva individuata nell'emisfero sinistro per poi diventare bilaterale nelle acquisizioni effettuate ad una età equivalente al termine.

Matrici di cross-correlazione

La progressiva specializzazione funzionale delle aree e la più forte focalizzazione delle correlazioni all'interno delle singole network è stata osservata tramite l'analisi inter-network ottenuta dall'analisi della correlazione dei segnali delle aree-RS e la generazione delle matrici di cross correlazione.

Le aree-RS con correlazione $r > 0.8$ all'interno di ogni network sono risultate essere: le aree mPFC bilaterali, il seed pCC ed una porzione inferiore del pCC, le due aree LatPar, le motorie primarie, le uditive corticali e profonde, la visiva, corticali e profonde.

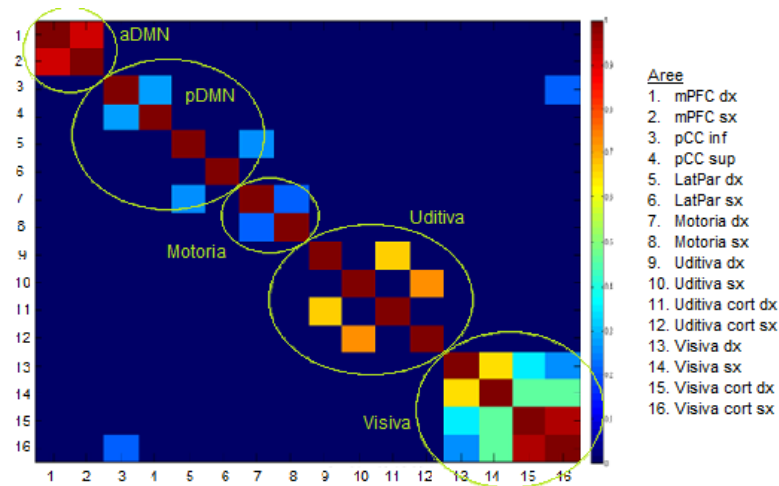


Figura 2.2.8. Matrice di cross-correlazione tra le aree appartenenti alle diverse reti, le correlazioni sono state calcolate sui segnali concatenati dell'intero gruppo. Sono visualizzate solo le $r > 0.2$

Nella matrice di cross-correlazione ottenuta sull'intero gruppo (fig. 2.2.5) è possibile osservare come le correlazioni più forti siano ottenute in corrispondenza delle singole network, in corrispondenza delle correlazioni più vicine alla diagonale della matrice.

Come è possibile osservare, la correlazione maggiore corrisponde alle aree con alta correlazione anche all'interno delle singole mappe SCA. Tuttavia, sono presenti due correlazioni extra-network, tra l'area motoria destra e la LatPar destra e tra la porzione inferiore della pCC e l'area visiva profonda sinistra. Tali correlazioni sono probabilmente dovute alla vicinanza anatomica tra le aree e all'abbondanza di connessioni a corto raggio tra loro.

Come già osservato nelle mappe SCA delle singole reti, anche le cross-correlazioni inter-network sono caratterizzate da un differente pattern nei due gruppi G1 e G2 (fig 2.2.6).

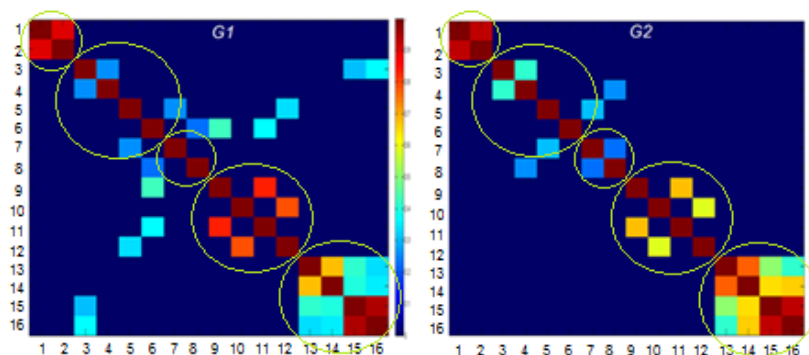


Figura 2.2.9. Matrici di cross-correlazione inter-network nei due gruppi G1 e G2.

Nella matrice di cross-correlazione di *G1*, si osservano cluster ad alta correlazione appartenenti alla aDMN, alle aree visive e alle aree uditive. Non appare correlazione tra le motorie nei due emisferi, mentre alcune aree della pDMN (pCC e LatPar) sono caratterizzate da una correlazione con aree appartenenti ad altre reti, anatomicamente vicine, mostrando una scarsa organizzazione funzionale della pDMN.

Nel passaggio al gruppo *G2* si osserva invece un generale aumento delle correlazioni intra-network per ciascuna rete. In particolare, si osserva un aumento della correlazione tra le aree omolaterali, tra quelle anatomicamente e funzionalmente vicine e comincia ad essere presente una correlazione tra le due aree motorie, anche se non particolarmente forte. In generale, si osserva una diminuzione tra le correlazione inter-network e un aumento della focalizzazione all'interno delle singole reti funzionali, suggerendo una maggiore organizzazione delle connessioni e una aumentata specializzazione delle aree che la compongono.

Matrice di cross-correlazione DMN

Andando ad analizzare nello specifico la rete DMN, che nei neonati risulta essere in forma ancora prototipale, sono state analizzate le correlazioni tra le aree risultate positivamente o negativamente significative al one-sample t-test di significatività di gruppo per aDMN e pDMN. Tali aree, sono coincidenti con le aree principali che descrivono il DMN negli adulti: pCC, mPFC e le due aree laterali parietali destra e sinistra. Da queste regioni è stato estratto il segnale ed è stata calcolata la matrice di cross-correlazione (fig 2.2.7) per valutare la correlazione congiunta delle due componenti del DMN.

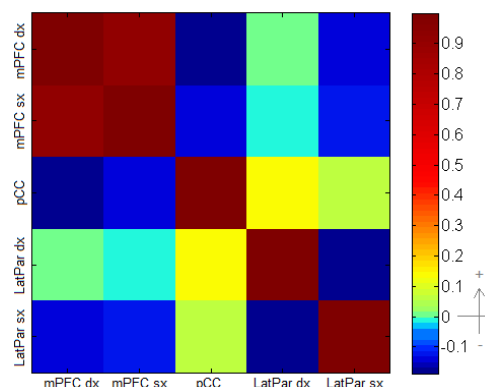


Figura 2.2.10. Matrice di cross-correlazione del DMN

Il risultato mostra una correlazione fortemente positiva tra i due seed mPFC e una correlazione positiva del pCC con le LatPar, mentre si riscontra una correlazione

negativa tra i due seed pCC e mPFC e tra la mPFC e la LatPar sinistra e una correlazione nulla tra la mPFC e la LatPar destra. Questi risultati sembrano ancora una volta confermare una netta separazione tra le due componenti anteriore e posteriore del DMN, dove in particolare le due componenti sono inversamente correlate, come ad indicare che a questa età le due reti siano funzionalmente distinte e rappresentino stati mentali differenti che non sono in grado di coesistere simultaneamente [Smith, 2012].

Effetto dell'età nella DMN

A partire dalla configurazione media calcolata sull'intero gruppo, sono stati individuati i cambiamenti che l'aumento dell'età durante il periodo pre-terminale ha indotto nella rete DMN. Un two-sample t-test ha permesso di localizzare, per ognuna delle due componenti (aDMN e pDMN), i cluster di voxel in cui l'età modifica significativamente il pattern di connettività funzionale (fig. 2.2.8). In particolare, nella pDMN i cambiamenti legati all'età sono riscontrati prevalentemente in regioni legate alla rete stessa (LatPar) e ad altre reti, come quella premotoria. Nella aDMN le aree maggiormente influenzate dall'aumento dell'età vengono individuate in coordinate che possono essere ricondotte a due aree frontali che normalmente sono caratterizzate da uno sviluppo molto tardivo: la corteccia dorso laterale prefrontale (DLPFC) e la frontopolare (FP).

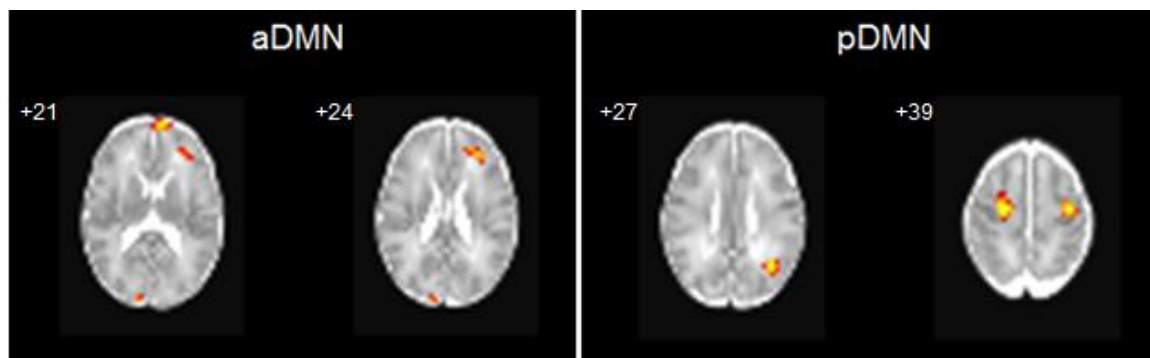


Figura 2.2.11. Aree che presentano correlazione positiva con l'età allo scan ($p < 0.001$). A sinistra sono mostrate le aree significative del aDMN, corrispondenti alla FP sx e DLPFC sx; a destra le aree significative del pDMN, corrispondenti a LatPar sx e premotoria bilaterale.

Correlazione con aree task-positive

Le aree task positive sono di particolare interesse poiché, essendo relative ad aree a maturazione tardiva, le connessioni funzionali con esse dovrebbero svilupparsi in età

più avanzata. Dall'analisi di cross-correlazione dei segnali delle FP, DLPFC, mPFC e pCC sono stati calcolati i valori r-coeff.

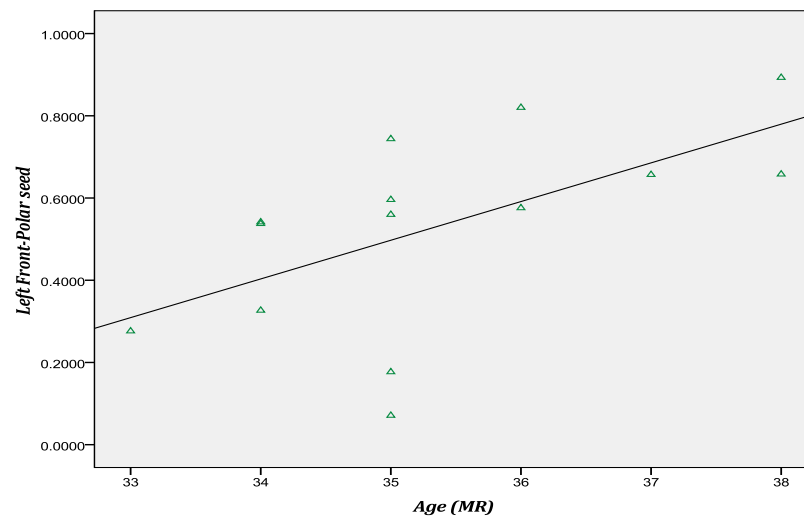


Figura 2.2.12. Scatter plot della correlazione degli r-coeff mPCF-FPsx con l'età dei soggetti allo scan.

L'analisi di significatività di gruppo sugli r-coeff ha evidenziato una correlazione significativa esclusivamente tra le due aree mPFC e l'area FP sinistra. In particolare, la mPFC sinistra ha ottenuto un valore di correlazione di gruppo $r=0.53$, con $p\text{-value}=0.035$ e $t=2.339$, mentre la mPFC destra ha ottenuto un valore di correlazione di gruppo $r=0.553$, con $p\text{-value}=0.026$ e $t=2.464$.

Infine, il t-test a due code utilizzato per calcolare la correlazione dei valori di r-coeff ha rivelato che nella aDMN, le r-coeff tra entrambe le mPFC e l'area frontopolare sinistra presentavano una correlazione con l'età (fig. 2.2.9): mPFC sinistra $r=0.59$, $p=0.026$, la mPFC destra $r=0.61$, $p=0.2$.

L'analisi di correlazione descrive l'associazione intrinseca tra le aree cerebrali appartenenti a diverse reti funzionali. In questo studio, l'analisi delle singole network di base (motoria, uditiva, visiva) ha riscontrato pattern equivalenti a quelli dei neonati a termine, da cui si verifica che la loro formazione avvenga già nel periodo prenatale. Al contrario la DMN è presente solo in forma prototipale, suddivisa in due componenti separate, una anteriore e una posteriore. Questi pattern sono coerenti con quelli trovati nei bambini nati a termine, dove le connessioni tra le due componenti del DMN vengono rilevate solo a partire dal primo anno di età. L'analisi di cross-correlazione all'interno del DMN e l'analisi della sua correlazione con l'età hanno fornito

interessanti informazioni riguardo alle modifiche indotte dall'età sulla maturazione delle connessioni funzionali dell'encefalo, anche con aree appartenenti ad altre network funzionali di alto livello, la cui maturazione è attesa nel periodo della adolescenza. Con l'aumento dell'età, le correlazioni sono infatti caratterizzate da un trend di crescita, che descrive un rafforzamento delle connessioni funzionali tra le aree anche in questo periodo. Questo suggerisce che, benché lo sviluppo di queste aree avvenga più avanti nel tempo, delle basi di connessione tra aree preposte ad alto livello sia già presente anche nei bambini prematuri.

2.3 Studio dello sviluppo delle connessioni funzionali del DMN con aree neurocognitive nei neonati pretermine mediante RS-fMRI

2.3.1 Materiali e Metodi

Partecipanti

In questo lavoro è stato studiato un gruppo di 20 neonati (13 maschi e 7 femmine) nati prematuramente, con età gestazionale mediana alla nascita di 31 SG + 5 giorni distribuiti in un intervallo compreso tra la 27 e la 34 SG.

I neonati prematuri sono stati reclutati tra tutti i pretermine nati entro la 37 settimana gestazionale, che sono stati sottoposti ad un esame RM per motivazioni cliniche su richiesta dell'Unità di Neonatologia dell'Ospedale San Raffaele. All'interno dell'intera popolazione di prematuri sottoposti a RM, sono stati selezionati 20 soggetti in grado di soddisfare i criteri di inclusione definiti per il nostro campione osservazionale: un encefalo entro i limiti di normalità, l'assenza di lesioni, un'età alla nascita entro la 34 SG e una acquisizione RM effettuata entro la 38 SG.

I criteri di esclusione sono stati: infezioni congenite, sindrome da anomalie congenite multiple, lesioni parenchimali intra-cerebrali, idrocefalo, malformazioni encefaliche congenite, disordini metabolici, emorragie intraventricolari, iperintensità puntuali nella WM in T1, leucomalacia periventricolare o altre condizioni patologiche visibili all'acquisizione RM. Tutti gli esami RM sono stati revisionati e interamente refertati da un neuroradiologo pediatrico.

Nella popolazione finale è stato effettuato, con esito positivo, un test per valutare la distribuzione normale all'interno dei parametri di età.

Nella seguente tabella (tab. 2.3.1), vengono mostrate le caratteristiche dei soggetti inclusi nello studio. In particolare vengono mostrate le variabili: età gestazionale alla nascita (espressa in settimane gestazionali, SG nascita), età allo scan (SG scan), se i bambini possono essere considerati prematuri gravi o lievi ($>32=1$ per i prematuri lievi), il peso alla nascita, il centile a cui corrisponde il peso alla nascita e le classificazioni AGA/SGA e SDS relative al suo peso.

<i>Soggetto</i>	<i>Genere</i>	<i>SG nascita</i>	<i>>32 GA</i>	<i>Peso nascita [gr]</i>	<i>AGA/SGA</i>	<i>SDS</i>	<i>Centile</i>	<i>SG scan</i>
1	M	30+3	0	1470	2	0,36	64	34+3
2	M	32+5	1	1350	3	-1,38	8	38+2
3	F	31+3	0	1635	2	0,49	69	34+6
4	M	31+3	0	1265	3	-0,94	17	35+4
5	M	30+3	0	815	3	-1,98	2	38+3
6	M	30+1	0	1205	2	-0,43	33	35+3
7	F	27	0	1035	2	1,01	84	33+4
8	F	32+4	1	1290	2	-1,26	10	36+4
9	M	30	0	1280	2	-0,06	48	35+5
10	M	32+5	1	1745	2	-0,22	41	35+3
11	M	27+6	0	990	2	0,01	50	35+3
12	M	31+6	0	1605	2	-0,1	46	35+3
13	F	31+6	0	1595	2	0,08	53	35+3
14	F	32+5	1	2345	2	1,8	96	35+5
15	F	32+5	1	1940	2	0,58	72	34+4
16	M	33+6	1	1710	2	-1,03	15	36+6
17	M	33+3	1	2370	2	1,08	86	35+1
18	M	31+4	0	940	3	-2,05	2	35+4
19	F	34	1	1080	3	-2,53	1	38
20	M	29	0	1415	2	0,83	80	33

Tabella 2.3.1. Informazioni cliniche dei soggetti partecipanti allo studio. In particolare, vengono prese in considerazione le caratteristiche dei nati pretermine che possono avere una influenza sullo sviluppo. Nella colonna AGA/SGA, i bambini con peso adeguato all'età gestazionale (AGA) sono indicati col valore 2 e i valori con peso basso per l'età gestazionale (SGA) sono indicati col valore 3.

In particolare, un soggetto è definito Small for Gestational Age (SGA), Appropriate for Gestational Age (AGA) o Large for Gestational Age (LGA) in funzione del centile su cui si trova il suo peso neonatale. Se il centile è inferiore al 10° allora il soggetto sarà definito SGA, AGA se il centile è compreso tra il 10° e il 90°, LGA se superiore al 90°.

A questa classificazione è anche associata una variabile, lo Standard Deviation Score (SDS) [Bertino, 2010], che traduce in un valore di deviazione standard la classificazione SGA, per indicare se un neonato è considerato piccolo per l'età gestazionale (SDS<-1.28), AGA (-1.28<SDS<1.28) o LGA (SDS>1.28). Tale parametro viene abitualmente utilizzato in clinica per la valutazione della prematurità.

Protocollo di acquisizione

Tutte le acquisizioni sono state effettuate su uno scanner Philips Intera 1.5 T (Philips Medical Systems S.p.A., Eindhoven, The Netherlands) eseguendo un protocollo per la valutazione clinica, per escludere la presenza di patologie cerebrali, seguito dal protocollo di acquisizione Resting State. La prima parte ha incluso immagini coronali e assiali pesate in T2 (TSE, TR=6244 ms, TE=150 ms, flip angle=90°, FOV= 160x140, voxel size=0.7x0.87x4 mm), immagini assiali e sagittali pesate in T1 (MS-SE, TR=524 ms, TE=15 ms, flip angle=90°, FOV= 170x150, voxel size=0.85x1.7x3 mm) e DWI (EPI-SE, TR=3383 ms, TE=91 ms, flip angle=90°, FOV= 180x180, voxel size=1.6x2x3 mm, sense=2, b-value=1000 s/mm²).

Il protocollo RS è invece stato acquisito mediante una sequenza di RS-fMRI (EPI-GE, TR=2500 ms, TE=29 ms, flip angle=90°, FOV= 180x180, voxel size= 2.25x2.25x3 mm, #sezioni=30) suddivisa in 2 sessioni da 70 volumi ciascuna, seguito da una sequenza volumetrica ad alta risoluzione pesata in T1 (FFE, TR=9.6 ms, TE=4.7 ms, flip angle=8°, FOV=200x181, voxel size=0.78x0.89x1.4 mm, #sezioni=64) e/o in T2 (TSE, TR=2000 ms, TE=160 ms, flip angle=90°, FOV=160x128, voxel size=0.89x1.25x1 mm, #sezioni=83).

L'intera acquisizione è stata condotta durante il sonno spontaneo del neonato senza alcun tipo di sedazione farmacologica. Per essere in grado di effettuare l'acquisizione in queste condizioni l'ambiente è stato preparato e mantenuto caldo, tranquillo e buio in modo da ottimizzare il comfort dei neonati durante tutta l'acquisizione. Per tutta la durata dell'esame i neonati sono stati monitorati da un neonatologo, anche con l'aiuto di un pulsossimetro, e nei casi di risveglio durante l'esame, l'acquisizione è stata sospesa fino ad un nuovo addormentamento. Nel caso di risvegli multipli del neonato o dopo un'acquisizione troppo lunga, con la sola immagine volumetrica mancante, l'acquisizione è stata conclusa per ridurre il disagio del soggetto.

Pre-processing delle immagini

Il pre-processing è stato suddiviso in differenti step di analisi effettuati utilizzando SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12/>). Per tutte le immagini è stato effettuato un reset dell'origine nella commissura anteriore e un riorientamento spaziale: sul piano sagittale seguendo la linea AC-PC, che unisce commissura anteriore e posteriore, e nei piani assiali e coronali ripristinando l'allineamento della scissura interemisferica con gli assi del FOV. In seguito, per correggere eventuali movimenti avvenuti durante l'acquisizione, le immagini funzionali di entrambe le sessioni sono state riallineate alla media funzionale. Prima di procedere con l'intera analisi, è stata effettuata una valutazione delle immagini strutturali e funzionali. Le immagini strutturali con grandi artefatti da movimento sono state escluse. Per i dataset fMRI sono state analizzate le stime dei movimenti calcolati durante il processo di riallineamento, individuando ed eliminando gli scan che superavano i limiti di accettabilità: traslazioni sopra i 2 mm e rotazioni maggiori di 2° rispetto ad uno dei tre assi. Il rilevamento di volumi caratterizzati da movimenti di questa ampiezza in neonati addormentati naturalmente non è raro, in particolare all'inizio o alla fine delle sequenze di acquisizione. A partire da uno scan con movimento eccessivo, sono stati eliminati gli scan corrispondenti ad un intero ciclo di oscillazione (che in sequenze con TR=2.5s e frequenza massima 0.1 Hz corrisponde a 5 volumi), in modo da non modificare le caratteristiche in frequenza del segnale.

Il passaggio di riallineamento è stato nuovamente ripetuto dopo l'eliminazione tali scan, per ottenere un risultato più accurato e successivamente le immagini funzionali sono state corrette per le distorsioni del campo. Dopo il riallineamento le immagini funzionali sono state coregistrate al riferimento anatomico. Generalmente questo riferimento è rappresentato da un'immagine volumetrica ad alta risoluzione pesata in T1 oppure in T2. Molte volte, queste sequenze però causano il risveglio dei bambini, perché sono caratterizzate da un tempo di acquisizione molto lungo e un forte rumore acustico. Per questa ragione le immagini sono spesso corrotte da artefatti da movimento e non possono essere utilizzate come riferimento anatomico. Al fine di uniformare il processo di pre-elaborazione per tutti i soggetti, l'immagine T2 assiale clinica, che è sempre presente, è stata a risezionata lungo la direzione z in modo da ottenere voxel isotropici. Inoltre, la T2 assiale è stata coregistrata ad una delle immagini volumetriche, quando sono state acquisite e sono di buona qualità. A questo punto le immagini funzionali di

tutti i soggetti sono state coregistrate all'immagine T2 assiale risezionata ed eventualmente coregistrata alle volumetriche.

Successivamente, l'immagine a più alta risoluzione a disposizione per ogni soggetto (o una delle volumetriche oppure l'assiale T2), è stata segmentata tramite il toolbox di segmentazione implementato in SPM12. Per ottimizzare questo processo, come riferimento per la segmentazione sono state utilizzate le mappe di probabilità di materia grigia, materia bianca e CSF specifiche per bambini pretermine di 35 SG [Kuliskova-Murgasova, 2011], che corrisponde all'età media del nostro campione. Le mappe di GM, WM e CSF ottenute per ogni soggetto durante la segmentazione sono state utilizzate per creare un template specifico basato sulla nostra popolazione. Questo è stato possibile utilizzando il toolbox Dartel, che si basa su un algoritmo di registrazione diffeomorfica [Ashburner, 2007] nel quale le immagini sono registrate utilizzando dei campi di deformazione. Questo processo consiste in una registrazione iterativa simultanea delle mappe di probabilità tissutali rispetto ad un template inizialmente ottenuto tramite una media delle stesse. Ad ogni iterazione sono calcolate le deformazioni per riportare le immagini al template e il nuovo template è generato come la media delle immagini ottenute applicando la trasformazione inversa. Alla fine di questa procedura, alle immagini anatomiche e funzionali iniziali di ogni soggetto viene applicata la deformazione finale stimata in tutti i voxel dell'immagine per la registrazione al template definitivo. Le immagini funzionali vengono infine sottoposte ad uno smoothing spaziale tramite un kernel caratterizzato da FWHM di 6 mm. Le medesime deformazioni vengono applicate alle immagini tissutali (GM, WM e CSF) che vengono utilizzate nei passaggi seguenti dell'analisi. In particolare, le mappe di GM, WM, CSF normalizzate nello spazio del template relativo alla specifica popolazione, sono sottoposte a soglia, con soglia pari a 0.1, e trasformate in maschere binarie. Al fine di generare una maschera di materia grigia per l'intera popolazione, le singole maschere GM vengono mediate e sottoposte ad un'ulteriore opera di binarizzazione.

Analisi di connettività funzionale

a.) Pre-processing del segnale BOLD

Dopo il pre-processing tramite SPM, l'analisi di connettività funzionale è stata eseguita utilizzando il toolbox REST [Song, 2011]. Per ogni soggetto, i segnali BOLD sono stati corretti mediante una regressione lineare per le variabili considerate rumore. Le variabili di rumore sono quelle che non descrivono il segnale neuronale, come ad esempio il

segnale globale, i segnali della materia bianca e del fluido cortico spinale e i parametri di movimento. In particolare, i segnali (globale, WM e CSF) vengono estratti dalle immagini funzionali di ogni soggetto utilizzando le apposite maschere, mentre i parametri di movimento sono derivati dal passaggio di riallineamento eseguito mediante SPM. Dopo la rimozione delle covariate di non interesse appena descritte, alle immagini funzionali è stata applicata la maschera di materia grigia della popolazione ed infine sono stati effettuati il detrend e il filtraggio passa-banda dei segnali. Come normalmente viene fatto nell'analisi RS, la banda passante del filtro è stata impostata fra 0.01 e 0.08 Hz, in modo da minimizzare l'influenza delle variabili di non interesse.

b.) Analisi di correlazione con seed sul singolo soggetto

Le mappe di connettività funzionale che descrivono le Resting State Networks (RSN) sono state generate tramite Seed Correlation Analysis (SCA). La correlazione di Pearson a livello dei voxel è stata effettuata tra tutti i segnali di tutti i voxel e il segnale estratto dalle regioni di seed.

In questo lavoro, l'interesse è focalizzato sullo studio del DMN. Per questo motivo le ROI sferiche, di raggio 5 mm, sono state localizzate bilateralmente nelle cortecce mediali prefrontali (mPFC) per il lobo anteriore e nella corteccia cingolata posteriore (pCC) per il lobo posteriore [Smyser, 2010]. Infine, sono state ottenute le mappe di correlazione fra la materia grigia e i seed selezionati.

c.) Analisi di correlazione con seed di gruppo (SCA di gruppo)

Per eseguire l'analisi di gruppo è stata applicata una trasformata Z di Fisher.

L'effetto di gruppo è stato valutato utilizzando SPM12, tramite un one-sample t-test. Le correlazioni significative sono state definite a $p < 0.05$ correggendo per FWE, con la valutazione delle correlazioni di gruppo sia positive sia negative.

d.) L'effetto dell'età

In questo gruppo di neonati pretermine, inoltre, si è voluto studiare se l'età nel momento in cui veniva effettuato l'esame RM avesse un effetto sullo sviluppo del network DMN. A questo scopo si sono osservati i cambiamenti significativi indotti dall'età dei soggetti nelle mappe di connettività, descritti tramite un one-sample t-test a $p < 0.001$ non corretto, dove le età in SG allo scan sono state considerate come covariate. Anche in questo caso sono state prese in considerazione le mappe Z di Fisher e si sono analizzate le correlazioni sia positive sia negative delle mappe di connettività con l'età allo scan.

Questo ha permesso di generare delle mappe dove sono state riconosciute le regioni cerebrali che sono significativamente influenzate dall'età durante lo sviluppo del DMN.

e.) Analisi di correlazione di gruppo dei segnali BOLD

Poiché questo studio è stato focalizzato sulla relazione tra sviluppo del DMN e l'età, sono stati esplorati i segnali delle regioni che sono considerate parte del DMN a differenti stadi di sviluppo (figura 2.3.9).

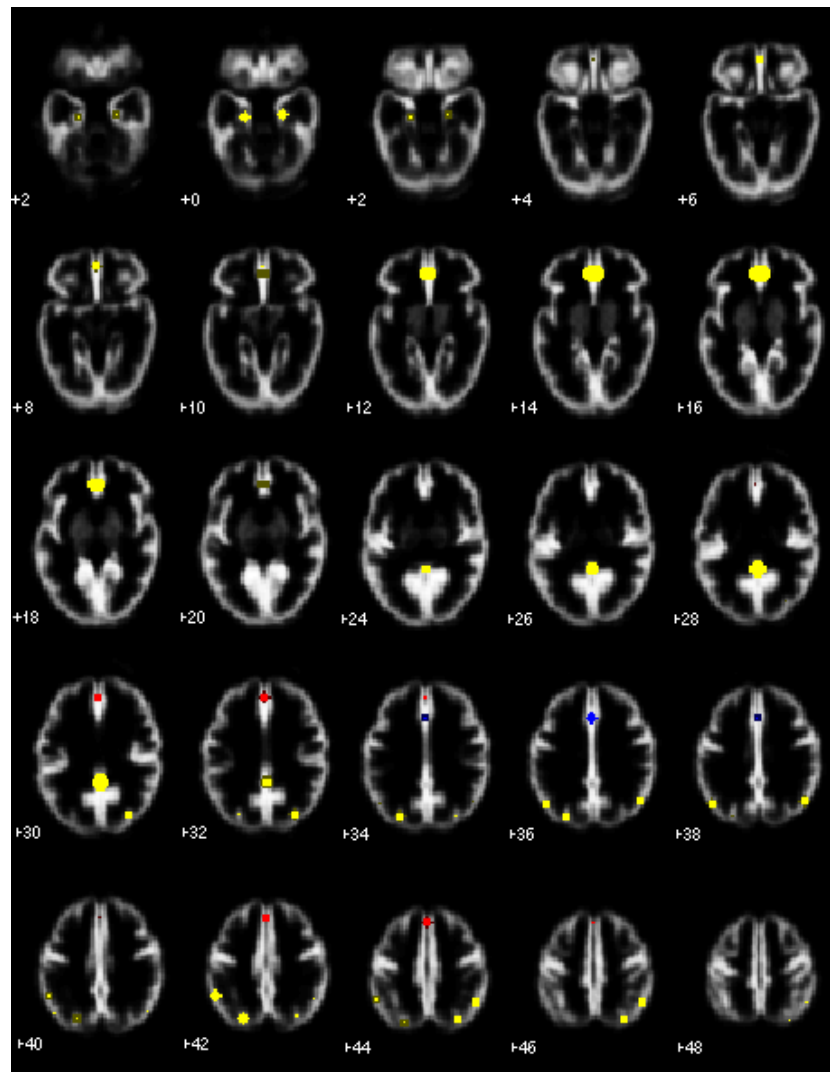


Figura 2.3.9. Vengono mostrate le tre configurazioni del DMN: a 2 anni (giallo), a 7 anni (giallo+rosso), adulto (giallo+rosso+blu)

Sulla base della letteratura [Greicius, 2003; Gao, 2009; Gao 2013; Supekar, 2010, Fair, 2010; Xiao, 2015] sono state riconosciute e studiate 4 fasi di sviluppo cruciali: la nascita, 2 anni (completamento della mielinizzazione), 7 anni (completamento dello sviluppo cerebrale), età adulta. In tabella 2.3.2 vengono mostrate le configurazioni del DMN nelle 4 fasi.

Configurazioni DMN				
Aree della rete	Neonati	2 anni	7 anni	Adulti
mPFC		•	•	•
pCC	•	•	•	•
giro Angolare		•	•	•
giro Sopramarginale		•	•	•
Precuneo		•	•	•
giro Superiore Occipitale		•	•	•
giro Paraippocampale		•	•	•
giro Frontale Medio (BA 8)		•	•	•
giro Frontale Medio (BA 9)			•	•
giro Frontale Medio(BA 10)			•	•
Corteccia Frontopolare				•
Corteccia Cingolata dorsale (dACC)				•

Tabella 2.3.2. Configurazioni del DMN. Vengono mostrate le aree incluse nelle 4 configurazioni della network corrispondenti alle diverse tappe dello sviluppo: neonati, 2 anni, 7 anni e adulti.

La configurazione del DMN è stata inoltre studiata per mettere in relazione la rete stessa con altre reti ad elevata funzionalità, coinvolte nello studio delle reti neurocognitive in adulti nati pretermine [White T.P., 2014]. Le reti di interesse sono la rete frontoparietale e la rete visuolaterale.

Aree	BA	Network frontoparietale	Network visuolaterale
IFG sx	45	•	
IFG dx	45	•	
DLPFC sx	46	•	
DLPFC dx	46	•	
Giro Angolare sx	39		•
Giro Angolare dx	39		•
Giro Sopramarginale sx	40	•	•
Giro Sopramarginale dx	40	•	•
Giro Occipitale Superiore dx	19		•
Giro Occipitale Superiore sx	19		•
MFG	8	•	
MFG	9	•	
MFG	10	•	
MFG Frontopolare	11	•	
dACC	32	•	

Tabella 2.3.3. Configurazione delle network frontoparietale e visuolaterale

Per il network frontoparietale le aree sono state localizzate nel giro frontale inferiore (IFG), nel giro frontale medio (MFG), nelle corteccie dorsolaterali prefrontali (DLPFC), nel giro sopramarginale e nella corteccia cingolata dorsale anteriore (dACC). Per il network visuolaterale le aree individuate sono state il giro angolare, il giro sopramarginale e il giro superiore occipitale (in tabella 2.3.3 e nelle figure 2.3.2 e 2.3.3 sono mostrate le diverse network cerebrali).

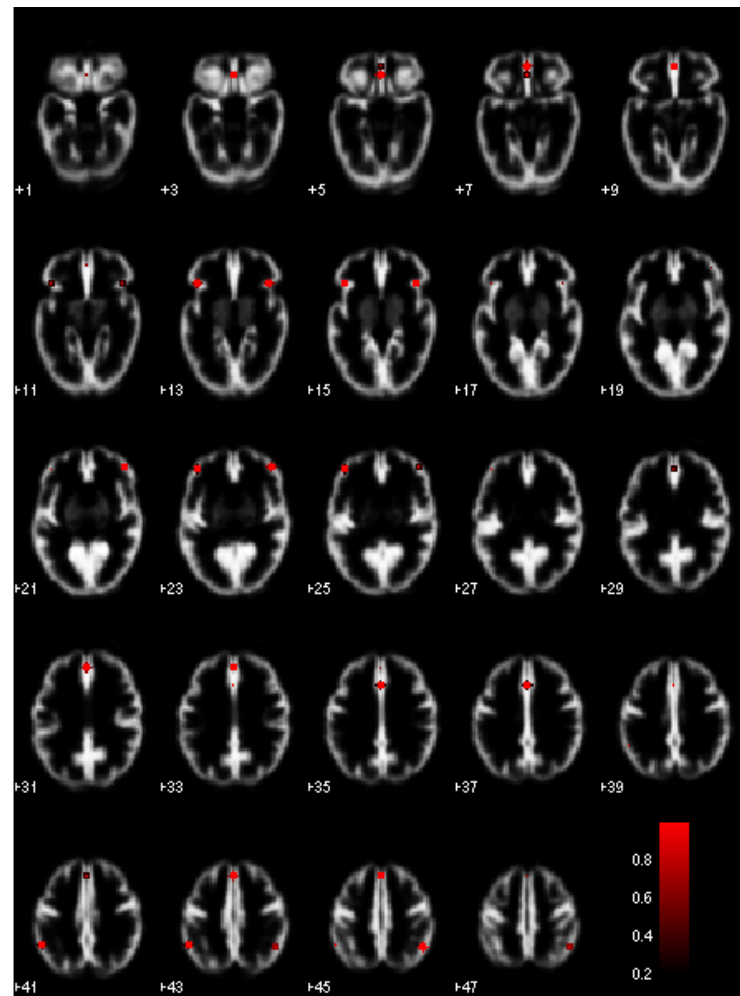


Figura 2.3.2 Vengono mostrate le ROI della rete frontoparietale

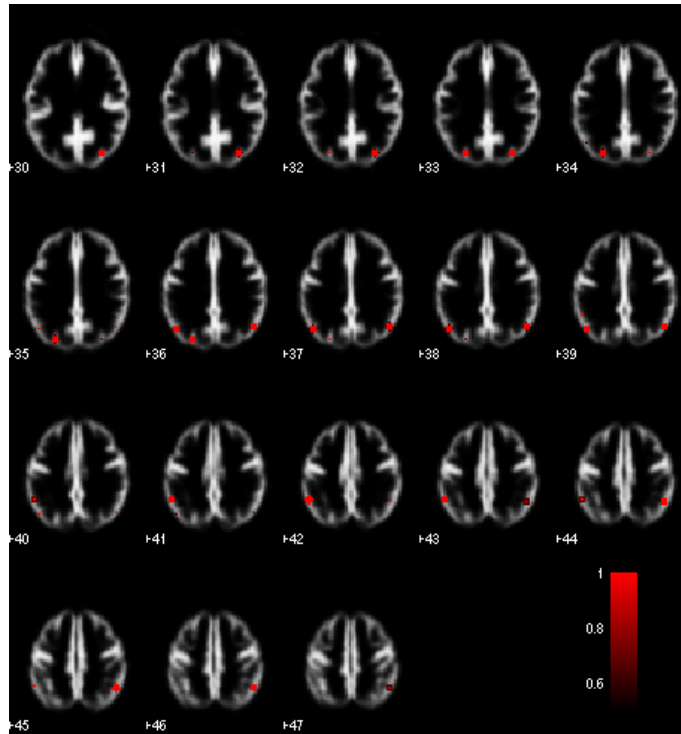


Figura 2.3.3 Vengono mostrate le roi della rete visiolaterale

Aree	BA	Rete	Coordinate (x,y,z) [mm]		
			Template	Media Soggetti	Deviazione Standard Soggetti
IFG sx	45	F	-23, -4, 12	-22.86, -4.14, 13.44	0.57, 1.28, 2.90
IFG dx	45	F	26, -4, 12	26.1, -4.05, 13.19	0.71, 1.03, 2.87
DLPFC sx	46	F	-23, 5, 23.5	-22.77, 5.05, 23.5	0.61, 0.48, 0.16
DLPFC dx	46	F	27, 6, 23	26.87, 6.05, 23.05	1.02, 0.22, 0.22
Giro Angolare sx	39	V	-25, -58, 37	-24.79, -57.65, 37.24	0.57, 1.02, 0.77
Giro Angolare dx	39	V	30, -55, 37	29.47, -55.77, 36.49	0.71, 1.28, 3.97
Giro Sopramarginale sx	40	V/F	-29, -50, 42	-27.99, -50, 42.2	0.92, 0.72, 0.69
Giro Sopramarginale dx	40	V/F	30, -50, 45	29.7, -50.15, 44.84	0.73, 0.49, 0.96
Precuneo sx	7	D	-12, -61, 42	-12.22, -60.95, 42.1	0.69, 0.39, 0.85
Precuneo dx	7	D	20, -60, 45	19.47, -60.15, 43.77	0.91, 0.49, 1.42
Giro Occipitale Superiore dx	19	VP	-14, -66, 35	-13.96, -66.05, 35	0.77, 0.22, 0
Giro Occipitale Superiore sx	19	VP	20, -66, 32	19.67, -66.05, 32.75	0.86, 0.53, 1.33
Giro Paraippocampale sx	36	D	-9, -27, 0	-8.85, -26.75, 0.52	0.74, 0.71, 1.57
Giro Paraippocampale dx	36	D	13, -26, 0	13.15, -25.92, 0.47	0.36, 0.41, 1.57
MFG	8	F/D	2, -2, 44	3.25, -2, 44	0.55, 0, 0
MFG	9	F/D	2, 5, 32	3.1, 5.12, 32.15	0.57, 0.45, 0.67
MFG	10	F/D	2, 8, 8	2.97, 8, 9.37	0.57, 0, 3.46
MFG Frontopolare	11	F/D	2, 2, 0	2.72, 1.8, 4.35	0.59, 0.89, 3.81
dACC	32	F/D	2, -8, 36	2.55, -8, 36.2	0.58, 0, 0.69

Tabella 2.3.4. Coordinate di tutte le aree che fanno parte delle tre reti in mm: DMN (D), frontoparietale (F) e visiolaterale (V)

Le coordinate del centro di queste aree sono state localizzate sulla maschera di GM della popolazione e poi aggiustate in ogni soggetto per prendere in considerazione le differenze di anatomia che sono state preservate sui singoli soggetti dopo la normalizzazione Dartel.

La tabella 2.3.4 indica le aree, le loro corrispondenze come aree di Broadmann, le loro coordinate in mm nello spazio di riferimento e la varianza delle coordinate nel gruppo.

Poiché i soggetti prematuri sono caratterizzati da una bassa maturazione nelle zone corticali implicate nello svolgimento di funzioni di alto livello, il processo di individuazione delle precise corrispondenze anatomiche delle ROI sul template e in tutti i soggetti è risultato abbastanza oneroso.

Il segnale BOLD medio di ogni area è stato estratto usando ROI sferiche di raggio 3 mm. La dimensione della ROI utilizzata è limitata (ed inferiore a quella utilizzata precedentemente nella SCA, 5 mm), ma è stata definita in modo da aumentare l'accuratezza del segnale estratto, tenendo conto di una serie di fattori quali: la dimensione delle immagini, il grado di maturazione dell'encefalo in quelle regioni, il posizionamento delle aree e le distorsioni di segnale che possono essere introdotte durante i passaggi di pre-processing.

Sulle serie temporali BOLD sono state calcolate la correlazione di Pearson con i segnali estratti dai seed del DMN e la significatività di gruppo di queste correlazioni nella popolazione, accertata tramite un T-test e tramite il test di significatività sulla distribuzione della correlazione di Pearson. Durante la analisi delle correlazioni sono stati selezionati e scartati i valori outlier rispetto al gruppo, cioè quelli che si discostano più di 2 deviazioni standard dalla media del gruppo. Tramite l'utilizzo del test non parametrico di Wilcoxon sui ranghi è stata calcolata la differenza delle correlazioni delle connessioni con l'età alla nascita su due gruppi, i nati dopo la 32 SG e i nati molto prematuri, ovvero prima della 32 SG, in modo da verificare se vi fosse una differenza significativa nei due sottogruppi.

In seguito, è stato effettuato un test binomiale sul segno delle correlazioni per analizzare se ci fosse una tendenza significativa per correlazioni di segno positivo o negativo. Un T-test ($p < 0.05$) è stato poi effettuato per testare la significatività della distribuzione dei valori assoluti di ogni connessione, per valutare se la forza della connessione fosse significativamente diversa da 0. Avendo testato la significatività del valore assoluto della forza della correlazione è stato effettuato un secondo T-test sui valori relativi delle

correlazioni per valutare quali soddisfano il T-test ($p < 0.05$) secondo cui la correlazione media è significativamente diversa da 0. Le correlazioni con dei coefficienti r significativamente diversi da 0 per i seed mPFC e pCC sono state utilizzate per gli step di analisi successivi.

Il valore di correlazione media è stato calcolato e testato per valutare la significatività della correlazione di Pearson nel gruppo, tramite il calcolo del valore t di significatività del test e della sua probabilità relativa:

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{N-2}}} \quad (19)$$

dove r è il valore della correlazione media del gruppo e N è la dimensione del campione della popolazione. Utilizzando questo test è stato possibile valutare in quali aree le connessioni funzionali hanno probabilità massima di essere presenti nella nostra popolazione.

Analisi di correlazione con l'età e SDS

Per essere in grado di seguire lo sviluppo della connettività funzionale del DMN nel tempo, è stata calcolata la correlazione tra l'età in SG allo scan e le correlazioni di connettività ($r\text{-conn}$) attraverso un processo simile a quello utilizzato per le mappe di seed correlation. È stato calcolato un one-sample T-test tra le $r\text{-conn}$ e le età, generando per ogni connessione un valore di correlazione e il suo p-value. Per visualizzare in modo più chiaro i cambiamenti indotti dall'età, sono stati generati dei grafici a punti per valutare in maniera visiva il trend dei valori di correlazione in funzione dell'età (gli scatter plot saranno mostrati nella sezione 2.3.2 relativa ai risultati).

La medesima analisi è stata effettuata prendendo in considerazione, al posto dell'età allo scan, la variabile SDS.

In particolare, questa correlazione è stata presa in considerazione per tenere conto della variabilità dei neonati reclutati, in quanto non tutti i bambini sono nati né acquisiti alla stessa età gestazionale, e di conseguenza non sono caratterizzati dalle medesime variabili antropologiche.

Analisi delle correlazioni tra network con Z-score

Per l'analisi delle correlazioni tra le network, ovvero tra le aree del DMN e quelle delle reti frontoparietale e visuolaterale, i valori di correlazione sono stati trasformati in Z-score, in modo da avere una misura standardizzata sulla base della quale confrontare i network, che trasponesse su una distribuzione con media e deviazione standard noti, la media e varianza dei coefficienti r per le connessioni tra le singole aree che compongono i network. Gli Z-score sono stati calcolati utilizzando per ogni regione di seed la media e la deviazione standard di tutte le correlazioni per tutti i soggetti per tutte le connessioni con le aree appartenenti ad almeno una delle tre reti. Per ognuna delle tre reti è stata calcolata la somma degli Z-score relativi alle aree della network a cui appartengono in modo da ottenere uno Z-score della network per ogni soggetto (Z-net). Le distribuzioni degli Z-net sono state utilizzate per calcolare le correlazioni tra le differenti network e, come precedentemente fatto per le singole connessioni, le correlazioni con l'età allo scan e l'indice SDS. Infine, è stata effettuata una regressione degli Z-net delle reti per verificare quali fossero le variabili in grado di predire il comportamento della network. I predittori inseriti nel modello di regressione sono stati individuati in base a dati individuati in letteratura [Walhovd, 2012; Kim, 2014] e valutazioni cliniche quali sesso, età allo scan, età alla nascita, età alla nascita x giorni di vita, giorni di vita, peso e SDS.

2.3.2 Risultati

i. SCA di gruppo

Le analisi di SCA sulla popolazione dei prematuri hanno permesso di ottenere le mappe di correlazione per le network cerebrali nell'intero gruppo. Le mappe mostrate nelle figure che seguono sono state ottenute tramite un two-sample t-test (FWE, $p < 0.05$).

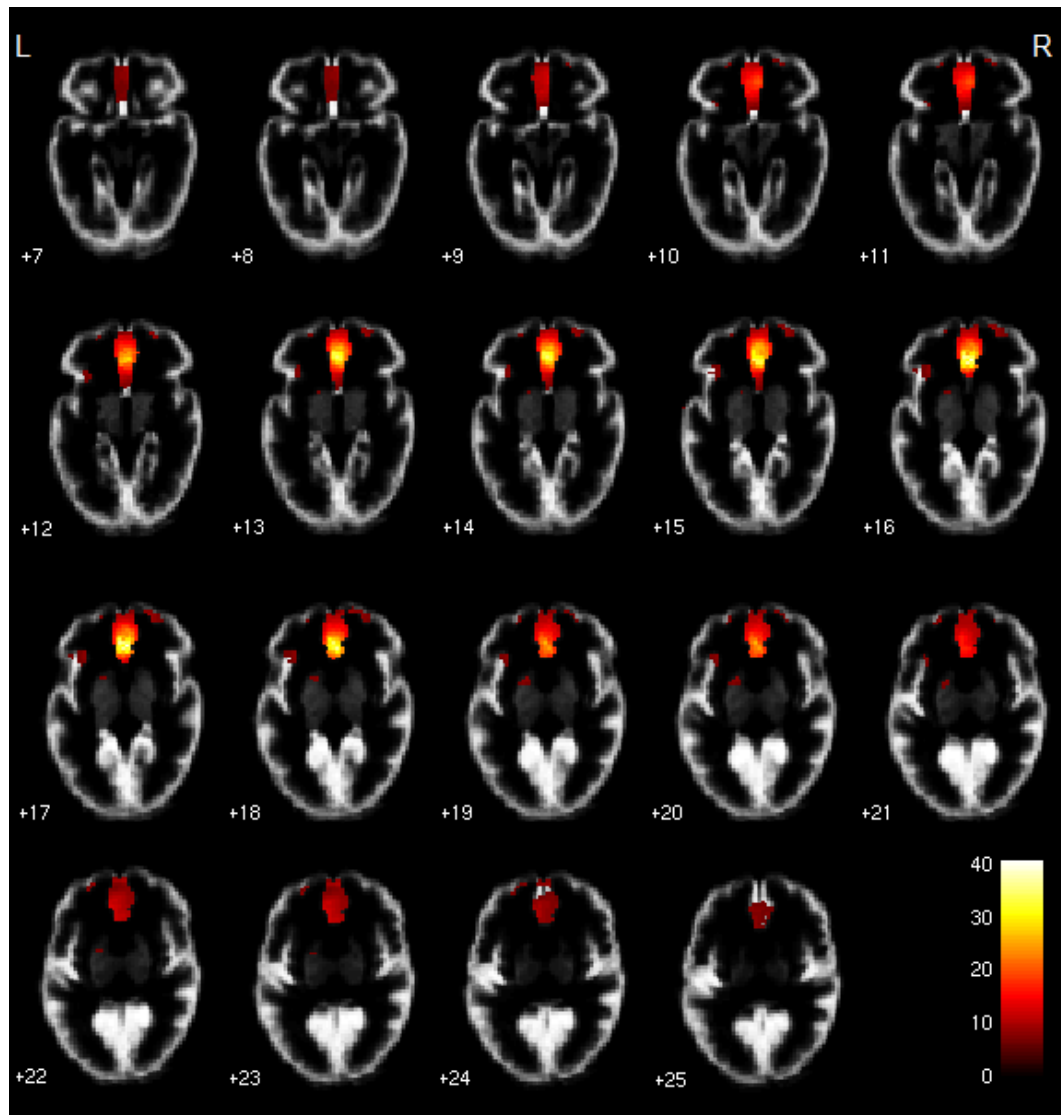


Figura 2.3.4. DMN anteriore: correlazioni positive mPFC (FWE, $p < 0.05$)

In figura 2.3.4 è mostrata la mappa delle correlazioni positive rispetto al seed posizionato nella mPFC della porzione anteriore del DMN. Com'è possibile osservare, le correlazioni risultano molto elevate nelle vicinanze del seed, nella corteccia prefrontale media e nel giro frontale inferiore bilaterale. Si osservano dei cluster di

correlazione anche nelle regioni frontopolari bilaterali, nella corteccia frontopercolare sinistra e nel putamen sinistro.

In figura 2.3.5 vengono mostrate le correlazioni negative rispetto al seed mPFC della porzione anteriore del DMN. Sono individuati dei cluster nella zona posteriore dell'encefalo, in corrispondenza della corteccia cingolata inferiore, della corteccia occipitale, nella temporomesiale destra. Due piccole regioni di correlazione negativa nella zona anteriore sono individuate nelle aree prefrontali sinistra e nella corteccia premotoria sinistra.

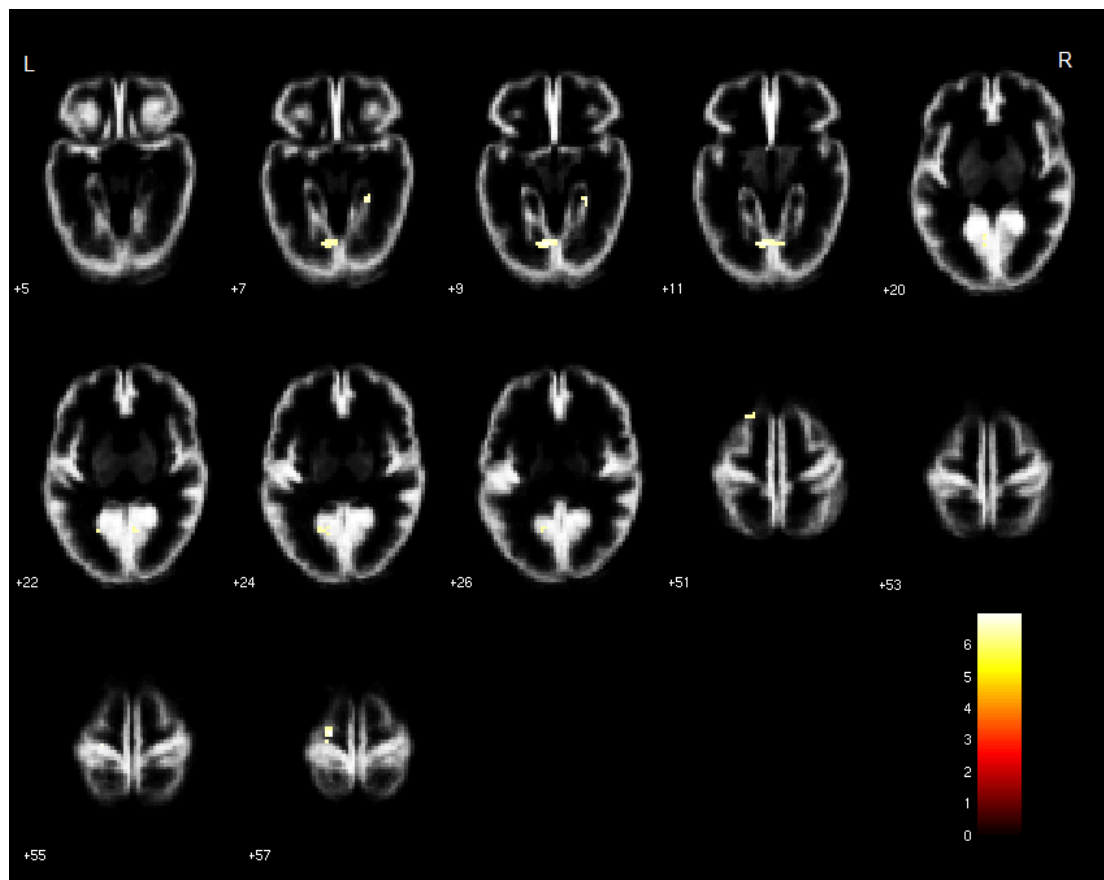


Figura 2.3.5. DMN anteriore: correlazioni negative mPFC (FWE, $p < 0.05$)

Si può notare come le correlazioni positive con mPFC siano tutte nella regione anteriore, dove è posizionato il seed, mentre le correlazioni negative con mPFC siano prevalentemente nella zona posteriore dell'encefalo, in corrispondenza della porzione inferiore della corteccia cingolata posteriore, in una zona attigua a quella dove è posizionato il seed pCC.

Per la parte posteriore della DMN, le correlazioni positive con l'area pCC sono mostrate in figura 2.3.6. Come si può osservare nella mappa, i valori più alti corrispondono a voxel contigui al seed, lungo la corteccia cingolata sia superiormente che inferiormente, estendendosi bilateralmente in prossimità di regioni temporali. Si individuano inoltre correlazioni nella zona posteriore dell'insula sinistra.

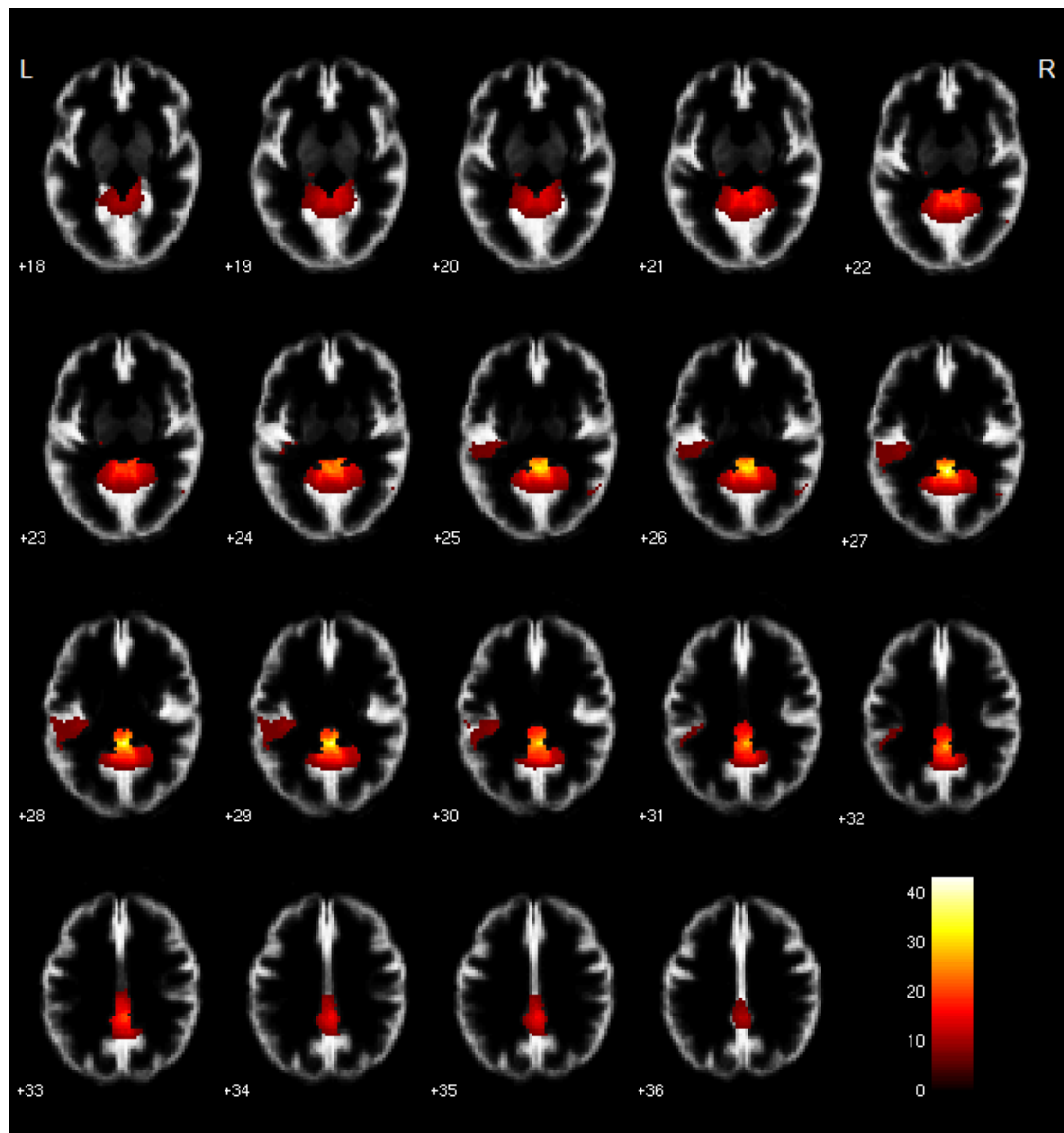


Figura 2.3.6. DMN posteriore: correlazioni positive pCC (FWE, $p < 0.05$)

In figura 2.3.7 si osservano le correlazioni negative con l'area pCC. Anche in questo caso, in modo invertito rispetto a quanto riscontrato con il seed mPFC dove le anticorrelazioni sono trovate nella parte posteriore, le correlazioni negative della pCC si

localizzano nella parte anteriore dell'encefalo, nella DLPFC destra e nelle aree premotorie bilaterali.

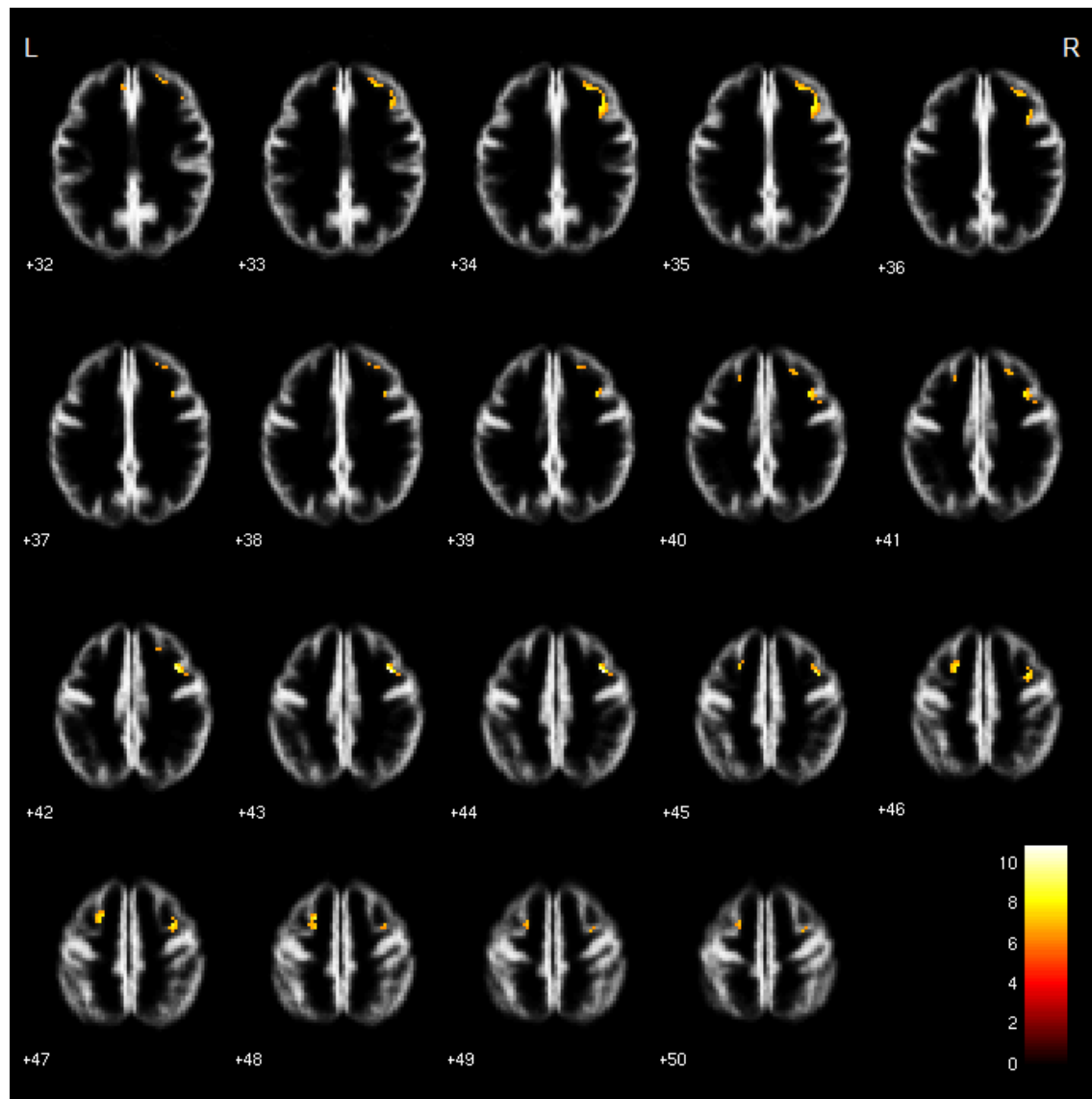


Figura 2.3.7. DMN posteriore: correlazioni negative pCC (FWE, $p < 0.05$)

ii. Correlazione dei segnali BOLD

Outliers

Per ogni seed sono state calcolate le correlazioni con ognuna delle aree prese in considerazione per le due network Frontoparietale e Visuoparietale.

Per l'esecuzione delle analisi di gruppo sono state analizzate le correlazioni e all'interno del campione sono stati individuati i soggetti e le aree outlier, con valori al di fuori del range di accettabilità stabilito, cioè $\text{media} \pm 2 * \text{stdDev}$.

Per ogni soggetto tutte le correlazioni con entrambi i seed sono risultate consistenti e

non è stata riscontrata la presenza di alcun valore outlier. Al contrario, effettuando l'analisi sulle singole correlazioni sono stati individuati alcuni soggetti outlier che sono stati eliminati per i passaggi di analisi seguenti, in modo da non inficiare i risultati finali. È tuttavia da specificare, che l'occorrenza di valori outlier sulla totalità delle correlazioni analizzate ha incidenza molto bassa (2.8%), poiché non tutte le connessioni hanno riscontrato la presenza di outlier e che il numero di outlier non è mai stato superiore ad 1, ad eccezione di un singolo caso per ciascun seed.

All'interno del gruppo sono stati individuati due soggetti caratterizzati dalla maggiore frequenza di valori outlier. Tali soggetti, all'analisi dei dati morfometrici, sono risultati essere due dei tre bambini del campione nati sottopeso (< 3 centile).

a. Confronto pretermine gravi/lievi - Test di Wilcoxon

Test non parametrici di Wilcoxon sono stati effettuati per verificare se le condizioni di nascita di prematurità grave o lieve e un peso inferiore rispetto a quanto atteso, influiscano sulla evoluzione delle connessioni cerebrali. In particolare, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

<i>mPFC</i>		
<i>Insula dx</i>	p-value	0.045
	rank <32SG	8.33
	rank >32SG	13.75
<i>MFG – BA8</i>	p-value	0.008
	rank <32SG	7.09
	rank >32SG	14.00

Tabella 2.3.5. Risultati significativi del test di Wilcoxon sui due gruppi >32SG e <32SG.

Il test di Wilcoxon ottenuto dividendo la popolazione in pretermine nati <32SG e >32SG, ha mostrato differenze significative tra il seed mPFC medio e l'insula destra e tra mPFC medio e MFG – BA8 (tabella 2.3.5). In entrambi i casi prematuri nati sotto le 32 SG mostrano correlazioni con forza significativamente minore rispetto a quelli nati sopra la 32 SG. Considerando invece le correlazioni con il seed pCC, non si riscontrano differenze significative con alcuna area.

Nel test di Wilcoxon ottenuto dividendo la popolazione in pretermine in AGA e SGA (tabella 2.3.6), i nati SGA presentano una correlazione di mPFC con MFG – BA8 di forza significativamente maggiore rispetto ai nati AGA. Prendendo invece in

considerazione le correlazioni con il seed pCC i nati SGA invece risultano avere correlazione di forza minore con l'insula destra e con la porzione inferiore destra del talamo rispetto ai nati AGA.

<i>mPFC</i>			<i>pCC</i>		
	p-value	0.028		p-value	0.05
<i>MFG – BA8</i>	rank AGA	8.53	<i>Insula dx</i>	rank AGA	12.00
	rank SGA	15.50		rank SGA	6.00
				p-value	0.036
			<i>Putamen dx</i>	rank AGA	12.10
				rank SGA	5.70

Tabella 2.3.6. Risultati significativi del test di Wilcoxon sui due gruppi AGA e SGA.

Una età minore alla nascita nel nostro campione mediamente corrisponde ad una età minore allo scan. Il risultato suggerisce quindi che la correlazione minore sia dovuta ad un minore livello di maturazione delle connessioni anatomiche tra il seed e le aree in oggetto. Una correlazione minore nella popolazione SGA può invece essere ricondotta ad una più alta probabilità di incidenza di danni neurologici post natali maggiore, con un conseguente profilo neuroevolutivo maggiormente deficitario. Le correlazioni di queste due aree con il pCC, come verrà approfondito in seguito, sono caratterizzate da valori negativi. Tra i neonati SGA e gli AGA, si assiste quindi ad un incremento della correlazione verso valori nulli, suggerendo una maggiore segregazione funzionale tra le due aree.

b. Segno delle correlazioni – Test binomiale

Per ognuno dei seed, sulle singole connessioni è stato effettuato un test binomiale sul segno delle correlazioni per analizzare se nell'intero gruppo vi sia una predominanza di valori positivi o negativi. Il test ha permesso di individuare quali sono le aree con una significativa predominanza di segno positivo, negativo o dove i valori di correlazione nei soggetti siano distribuiti non uniformemente tra positivi e negativi.

In particolare, rispetto al seed pCC risultano avere segno significativamente negativo: giro angolare destro (75%, $p=0.041$), giro sopramarginale destro (80%, $p=0.012$), precuneo destro (90%, $p=0.000$), giro paraippocampale sinistro (75%, $p=0.041$), MFG – BA9 (85%, $p=0.003$), MFG – BA10 (75%, $p=0.041$), dACC (85%, $p=0.003$), mPFC

sinistra e mPFC medio (75%, $p=0.041$). Risultano avere correlazione con segno positivo le due porzioni del talamo destra e sinistra (100%, $p=0$).

Rispetto al seed mPFC medio, invece, risultano avere correlazione con segno significativamente negativo: pCC (75%, $p=0.041$) e talamo sinistro (75%, $p=0.041$). Risultano avere segno positivo: IFG sinistra (85%, $p=0.003$), DLPFC destra (75%, $p=0.041$), insula sinistra (85%, $p=0.003$), insula destra (75%, $p=0.041$), giro angolare sinistro (75%, $p=0.041$), giro sopramarginale destro (80%, $p=0.012$), MFG – BA9 (85%, $p=0.003$), MFG – BA10 (100%, $p=0$) e le due porzioni destra e sinistra del putamen (75%, $p=0.041$).

È interessante notare come vi sia un trend di correlazione negativa tra aree anteriori e aree posteriori. In particolare, si osserva una correlazione con segno negativo tra pCC e mPFC (75%, $p=0.041$), mentre le altre aree del lobo frontale, MFG BA9 e BA10, sono caratterizzate da correlazione positiva con mPFC e negativa con pCC, così come accade anche al giro sopramarginale destro. Un'altra area posta nella regione anteriore caratterizzata da correlazione prevalentemente negativa con pCC è la dACC, mentre l'insula, la IFG sinistra e la DLPFC destra risultano caratterizzate da correlazione prevalentemente positiva con mPFC.

c. Forza delle correlazioni – T-test

La forza delle correlazioni è stata valutata tramite un t-test per analizzare se la distribuzione fosse significativamente diversa da zero e potesse essere ritenuta consistente all'interno del gruppo. In particolare, il calcolo è stato effettuato sia sul valore assoluto delle correlazioni, per valutarne la forza assoluta, sia sul valore relativo, per valutare se anche in presenza di non uniformità di segno la correlazione possa essere considerata significativa all'interno del gruppo.

Partendo dalla significatività dei valori assoluti, per ognuno dei due seed tutte le connessioni sono risultate avere una forza significativamente diversa da zero. Alzando la soglia al valore 0.1 alcune connessioni non superano il test di significatività, queste sono rappresentate per il seed mPFC dalle connessioni con le aree MFG – BA8 ($p=0.056$) e dalla corteccia superiore occipitale destra ($p=0.0975$), mentre per il seed pCC dal giro sopramarginale sinistro ($p=0.079$).

Diverso è il risultato analizzando la significatività dei valori relativi, dove una buona percentuale delle connessioni non risulta avere forza significativamente diversa da zero.

In particolare, si osserva una forza non significativa in quelle regioni dove non è stato riscontrato un trend significativo nel segno delle connessioni.

Per il seed mPFC le regioni che risultano avere correlazioni significativamente maggiori di zero sono: IFG bilaterali, DLPFC destra, Insula bilaterale, giro angolare bilaterale, giro sopramarginale destro, precuneo destro, giro superiore occipitale destro, giro paraippocampale bilaterale, MFG – BA9, MFG – BA10 e putamen bilaterale. Risultano invece avere correlazioni significativamente minori di zero il pCC e il talamo sinistro.

Per il seed pCC le regioni che risultano avere correlazioni significativamente positive sono il talamo bilaterale e la DLPFC sinistra. Risultano invece significativamente negative le correlazioni con le aree: giro angolare destro, giro sopramarginale destro, il precuneo bilaterale, il giro occipitale superiore sinistro, MFG – BA9, MFG – BA10, dACC, l'area frontoparietale – BA11 e la mPFC. La connessione del giro paraippocampale sinistro con il pCC ($r=-0.11$, $p=0.09$) non risulta invece significativamente diversa da zero, nonostante il test binomiale abbia riscontrato un trend negativo riguardo i segni delle correlazioni.

È interessante notare come le aree le cui correlazioni sono risultate significative sia per pCC che per mPFC presentino andamenti differenti. Tra queste si possono individuare il giro sopramarginale destro, il giro angolare destro, il precuneo destro, il giro paraippocampale sinistro, MFG – BA9 e MFG – BA10 caratterizzate da correlazioni positive con mPFC e negative con pCC, mentre il talamo risulta correlato positivamente con pCC e negativamente con mPFC. La connessione funzionale tra i due seed mPFC e pCC risulta significativamente negativa ($r=-0.185$, $p=0.004$). Alcune aree presentano correlazioni significative con uno o con l'altro seed a seconda della loro localizzazione (destra o sinistra). È il caso della DLPFC, del precuneo e del giro occipitale superiore che risultano positivamente correlati con mPFC nell'emisfero destro e con pCC nell'emisfero sinistro.

Le connessioni dei due seed con le aree DLPFC, giro angolare, giro sopramarginale e precuneo sono di particolare rilevanza, perché queste aree appartengono alle due reti anticorrelate (task-positive e task-negative) [Fox, 2005] che negli adulti caratterizzano la connettività cerebrale intrinseca. Nel nostro campione, vengono riscontrate correlazioni significativamente positive di mPFC con il giro angolare sinistro, il giro sopramarginale destro e DLPFC destra e tra pCC e DLPFC sinistra. Vengono invece riscontrate correlazioni significativamente negative di pCC con il giro angolare destro,

il giro sopramarginale destro, il precuneo destro e mPFC. Queste correlazioni mostrano un pattern quasi opposto a quello che si riscontra negli adulti, in cui i due seed sono positivamente correlati tra loro e con il giro angolare, il giro sopramarginale e il precuneo, mentre sono negativamente correlati con le aree DLPFC che fanno parte della rete task-positive. Questi risultati fanno presupporre che nei prematuri le reti primordiali siano già formate e che tra le loro aree le correlazioni siano dipendenti per la maggior parte da connessioni anatomiche dovute alla vicinanza. Con lo sviluppo si assiste invece ad una maggiore specializzazione funzionale delle aree che modifica il segno e il valore di tali correlazioni, generando due reti (task-negative DMN e task-positive) che risultano negativamente correlate tra loro.

d. Significatività di gruppo – Significance of Pearson Product Moment Coefficient

Tra le varie correlazioni quella tra mPFC e MFG – BA10 risulta significativa nell'intero gruppo, con $r=0.614$, $p=0.0019$ e $t=3.307$, così come la correlazione tra MFG – BA10 e le due porzioni destra e sinistra della mPFC ($r=0.98$, $p=10^{-7}$, $t=20.374$). Tra le altre correlazioni positive appaiono significative nel gruppo, quella tra pCC e il talamo destro ($r=0.404$, $p=0.048$, $t=1.769$) e la correlazione tra la porzione sinistra della mPFC e la IFG sinistra ($r=0.374$, $p=0.05$, $t=1.711$).

Questi risultati sono in accordo il trend osservato con le mappe SCA, in cui le correlazioni significative rispetto ai seed hanno segno positivo con le aree localizzate nella stessa regione cerebrale (anteriore con anteriore e posteriore con posteriore), mentre hanno correlazione negativa con le aree appartenenti alla regione opposta (anteriore con posteriore). Questa correlazione negativa suggerisce che le connessioni anatomiche tra le due regioni non siano ancora completamente sviluppate.

e. Correlazione con età allo scan

L'analisi delle *r-conns* rispetto all'età ha permesso di individuare delle connessioni significative per entrambi i seed. Per il seed pCC sono risultate avere una correlazione significativa con l'età due *r-conns* negative (fig. 2.3.8), quella con MFG – BA10 ($r = -0.6361$, $p=0.0026$) e quella con l'area FP – BA11 ($r = -0.6482$, $p=0.002$). Una ipotesi che potrebbe spiegare l'andamento di questa correlazione è la sgregazione funzionale delle aree. Nella analisi dei segnali BOLD, generalmente aree appartenenti a network funzionali distinte risultano inversamente correlate perché lo svolgimento di differenti funzioni cognitive non avviene in maniera sincrona.

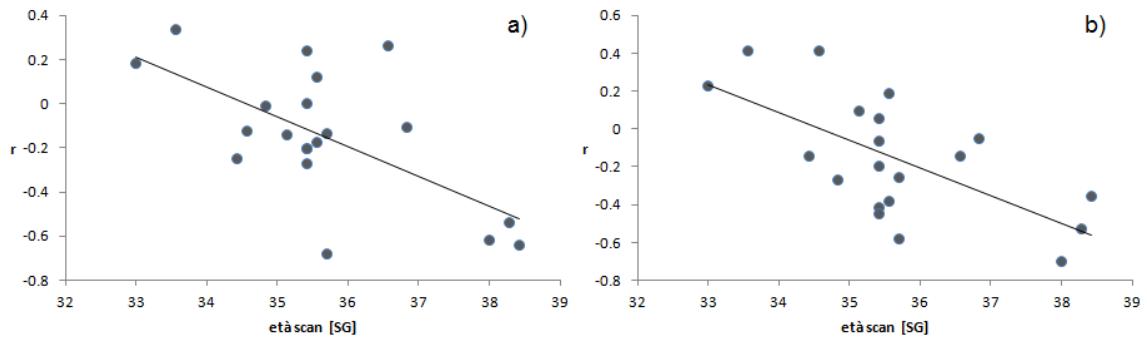


Figura 2.3.8. Correlazioni di *r-conn* con l'età allo scan. Connessioni di pCC con: a) MFG - BA10; b) FP - BA11

Per il seed mPFC risultano significative rispetto all'età le *r-conn* (fig. 2.3.9) con le aree MFG – BA8 ($r = 0.621$, $p=0.004$) e dACC ($r=0.531$, $p=0.016$).

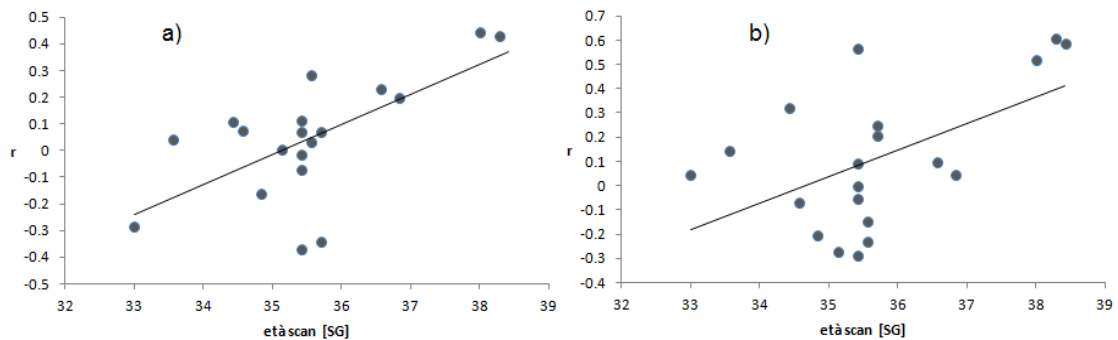


Figura 2.3.9. Correlazioni di *r-conn* con l'età allo scan. Connessioni di mPFC con: a) MFG – BA8; b) dACC

La significatività di queste correlazioni può essere spiegata con l'appartenenza delle aree mPFC, MFG e dACC alla stessa rete funzionale, quella del DMN. Infatti, aree che svolgono compiti strettamente legati sono caratterizzate da una specializzazione funzionale simile e da una maggiore sincronizzazione del segnale, che si traduce in una correlazione maggiore.

Non risulta invece significativa la relazione con l'età delle *r-conn* tra i due seed mPFC e pCC (fig 2.3.10), $p=0.166$ e $r = -0.322$.

Questa correlazione, benché non significativa, presenta un trend negativo, che conferma come a questa età vi sia una separazione funzionale tra le due componenti anteriore e posteriore del DMN. La segregazione funzionale può essere in parte spiegata anche dal fatto che in bambini così piccoli i processi cognitivi implicati nel funzionamento di questa rete non si siano completamente sviluppati, quindi non siano in grado di

interagire, e in parte che da un punto di vista strutturale le connessioni tra le due regioni non siano ancora presenti. L'andamento della relazione, anche se non significativo, può indicare che tra le due componenti sia già presente una connessione funzionale, ma che la specializzazione funzionale che le unirà in un unico sistema non sia ancora sviluppata.

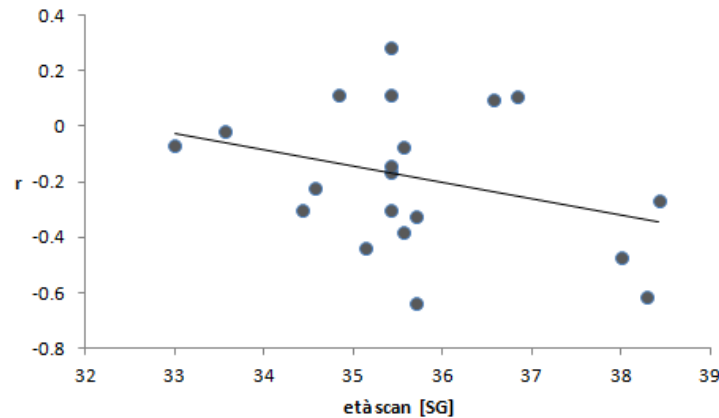


Figura 2.3.10. Correlazioni di r-connn con l'età allo scan. Connessioni di pCC con mPFC.

In generale, con l'età si osserva un graduale rafforzamento delle correlazioni tra il seed anteriore e aree situate nel lobo frontale, mentre la correlazione del seed posteriore con aree situate in posizioni anteriori tende a diminuire ulteriormente.

f. Correlazione con SDS

L'analisi delle r-connn rispetto al parametro SDS ha invece messo in luce solo due correlazioni significative (fig. 2.3.11), quelle relative alle connessioni di pCC con il giro sopramarginale sinistro ($r=0.53$, $p=0.018$) e di mPFC con MFG – BA8 ($r = -0.594$, $p=0.007$).

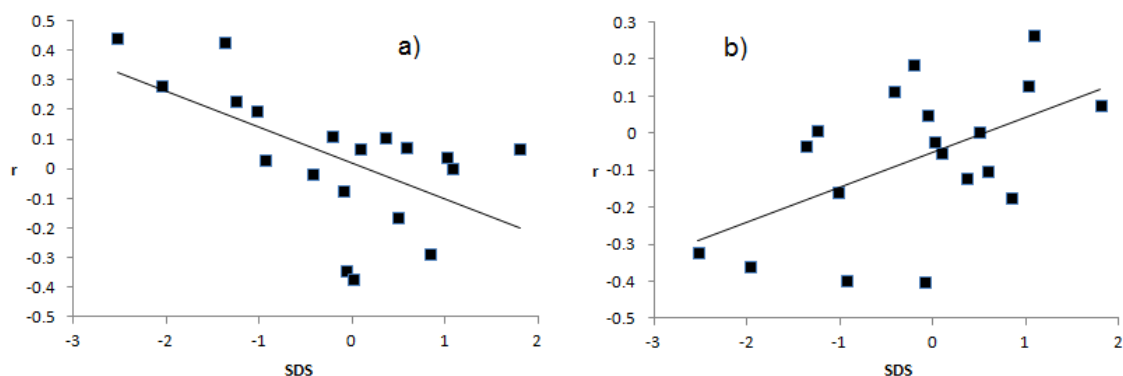


Figura 2.3.11. Correlazioni di r-connn con SDS. Connessioni: a) pCC con giro sopramarginale sinistro; b) mPFC con MFG – BA8

Il parametro SDS descrive lo scostamento del peso del neonato rispetto alla media nella popolazione neonatale: valori negativi sono riconducibili a bambini nati sottopeso, mentre valori maggiori di 0 a bambini nati con peso maggiore della media. L'andamento della correlazione rispetto a questo valore mostra quindi come il peso alla nascita sia in grado di descrivere un incremento o un decremento della correlazione. In particolare la correlazione tra le regioni mPFC e MFG – BA8 conferma nuovamente la sua stretta dipendenza dai parametri antropometrici alla nascita (età, SGA, SDS) per cui un neonato generalmente meno sviluppato sarà caratterizzato da una correlazione minore o addirittura inversa.

iii. Correlazione degli Z-score

a. Confronto pretermine gravi/lievi – Test di Wilcoxon sugli Z-score della rete

L'analisi sulle distribuzioni degli Z-net ha permesso di mettere in luce alcune differenze tra le correlazioni delle network con i due seed. In particolare, il test non parametrico di Wilcoxon sulle Z-net delle reti DMN, Frontoparietale e Visuolaterale utilizzando come seed mPFC non ha riscontrato differenze né rispetto all'età di nascita (>32 SG e <32 SG) né rispetto alla nascita SGA o AGA. Utilizzando come seed il pCC si individua una differenza significativa nelle configurazioni 2 anni, 7 anni e adulti del DMN, che sono caratterizzate da valori di Z-score più alti nei nati AGA rispetto ai nati SGA.

b. Correlazione degli Z-score con l'età allo scan

Analizzando gli Z-net delle network correlate con entrambi i seed, è stata riscontrata una correlazione significativa tra tutte le network. Tuttavia, questo risultato in parte potrebbe essere dovuto alla inclusione di alcune aree in più di una network.

Effettuando una analisi di correlazione tra le Z-net e alcuni parametri (giorni di vita, SDS, peso alla nascita, età allo scan) risulta di particolare interesse la correlazione significativa delle network con l'età allo scan. In particolare, le Z-net della rete Frontoparietale (fig. 2.3.12) risultano significativamente correlate con l'età allo scan sia utilizzando come seed mPFC ($r= 0.467$, $p=0.038$) sia utilizzando come seed pCC ($r= -0.582$, $p=0.007$).

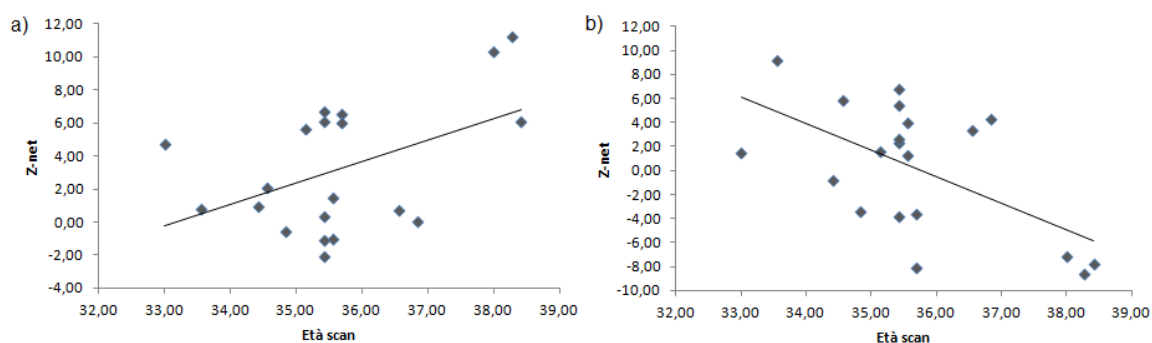


Figura 2.3.12. Correlazione dell'età allo scan con i valori di Z-net per la network Frontoparietale dei seed: a) mPFC e b) pCC.

Le due correlazioni hanno però un andamento opposto, mostrando come la rete Frontoparietale durante il periodo pretermine abbia un rafforzamento con il seed mPFC e una maggiore segregazione funzionale rispetto al seed pCC.

Utilizzando come seed l'area pCC risultano significative anche le Z-net delle tre configurazioni del DMN (2 anni: $r = -0.539$, $p = 0.014$; 7 anni: $r = -0.519$, $p = 0.019$; adulto: $r = -0.568$, $p = 0.009$) (fig. 2.3.13).

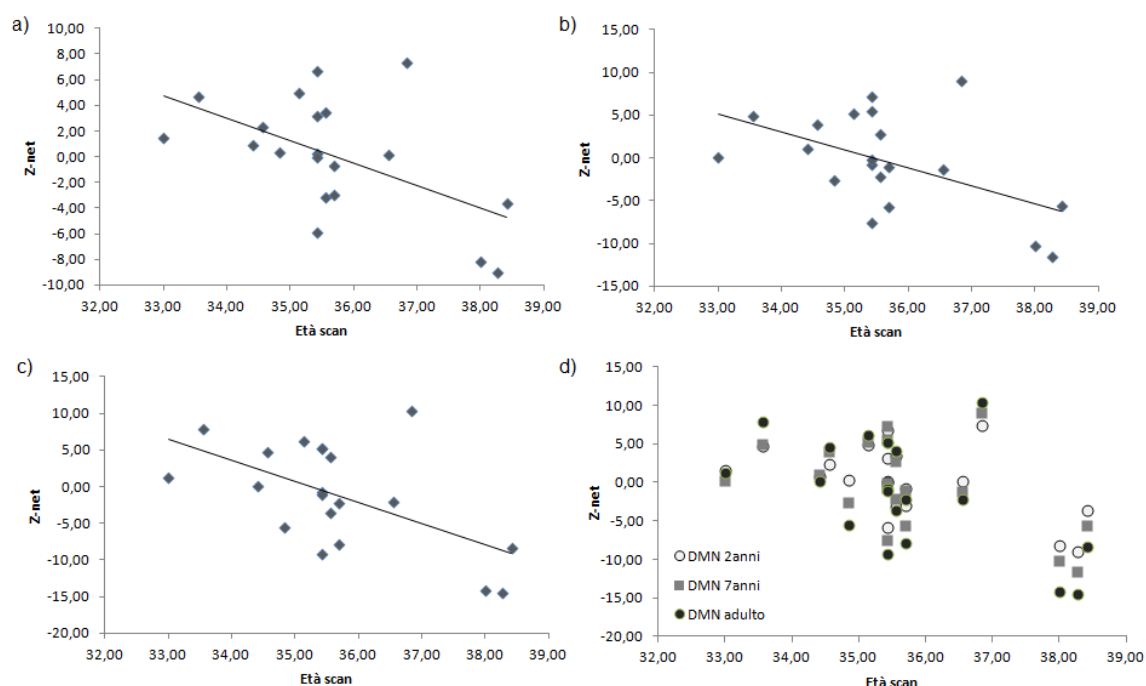


Figura 2.3.13. Correlazione dell'età allo scan con i valori di Z-net relativi al seed pCC per le network: a) DMN 2 anni, b) DMN 7 anni, c) DMN adulti, d) confronto tra le tre configurazioni di DMN.

Si può notare come tutte le configurazioni abbiano un trend negativo in relazione all'età, che risulta simile in tutte e tre le configurazioni. Un andamento di diminuzione

progressivamente più accentuata nelle tre configurazioni può essere ricondotto ad un maggiore effetto di segregazione funzionale delle aree che vengono introdotte in ognuna, in particolare quindi le regioni MFG, la dACC e la corteccia frontopolare.

La rete visuolaterale non risulta significativamente correlata con l'età né utilizzando come seed mPFC né utilizzando pCC, lasciando supporre che in questo intervallo di età le correlazioni all'interno della rete non vengano particolarmente influenzate dall'età.

c. Correlazione degli Z-score con SDS

La correlazione degli Z-score con SDS non ha prodotto risultati significativi per alcuna regione né alcuna network.

iv. Regressioni con i parametri di interesse

Le regressioni sono state calcolate definendo due modelli composti rispettivamente dai fattori: modello 1) SDS, sesso, età allo scan e giorni di vita; modello 2) aggiunta dei regressori età allo scan*giorni di vita ed età al quadrato.

Le regressioni sono state calcolate per le Z-net delle network Frontoparietale e Visuolaterale rispetto ad entrambi i seed mPFC e pCC.

Per il seed mPFC, la rete visuolaterale non è risultata avere correlazioni significative con nessuno dei regressori né un effetto di predizione da parte di nessuno di essi.

La rete frontoparietale conferma ancora la presenza di correlazioni significative con l'età allo scan (one-tail test: $r=0.467$, $p=0.019$) e del suo valore quadratico (one-tail test: $r=0.477$, $p=0.017$).

Per il seed pCC, la rete visuolaterale non è risultata avere correlazioni significative con nessuno dei regressori né un effetto di predizione da parte di nessuno dei fattori presi in considerazione, anche se la correlazione bivariata con l'età e l'età quadratica hanno valori di p (one-tail $p=0.065$) di poco superiori alla soglia di significatività.

La rete frontoparietale conferma anche in questo caso la presenza di correlazioni significative con l'età allo scan (one-tail test: $r= -0.582$, $p=0.004$) e del suo valore quadratico (one-tail test: $r= -0.587$, $p=0.003$). In particolare, l'analisi dei modelli per questa network ha dato risultati significativi descrivendo l'effetto di predizione dei regressori utilizzati. Un ANOVA sui due modelli ha permesso di verificare come la

regressione ottenuta utilizzando il modello 1 sia significativa ($F=3.204$, $p=0.043$). Inoltre, il modello 1 risulta caratterizzato da un valore di cambiamento di $R^2=0.461$ che risulta significativo, definendo che il modello regressione abbia un carattere predittivo e sia in grado di migliorare significativamente la stima delle correlazioni. In particolare all'interno del modello è uno il coefficiente di regressione con significativo valore predittivo, l'età allo scan ($p=0.005$, $t=-3.287$).

Il fatto che la maggior parte delle significatività legate al modello di predizione siano relative alla rete frontoparietale, è molto interessante. Questa rete infatti è formata da aree che compongono sia il DMN che da aree che compongono la rete task-positiva. La regressione indica quindi che il parametro di età allo scan possa essere un predittore significativo riguardo all'evoluzione della relazione tra queste due reti e della specializzazione funzionale delle aree che le compongono.

2.3.3. *Discussione*

La rete DMN è legata a delle funzionalità molto complesse, che nei neonati non sono ancora sviluppate, se non sotto forma di riflessi primordiali. Nei neonati pretermine, così come nei neonati a termine, vengono riscontrate due componenti (anteriore e posteriore) riconducibili a due forme prototipali di questa network. Esse pongono la base per lo sviluppo futuro della rete DMN che avverrà solo quando le aree preposte matureranno una sufficiente specificità funzionale. Le prime forme di DMN completa vengono riscontrate a partire dal primo anno di età, con la creazione dei collegamenti tra pCC e mPFC [Gao, 2009]. Nel campione da noi analizzato la correlazione tra i due seed pCC e mPFC ha invece segno negativo, a confermare l'ipotesi della loro distinzione funzionale. Il segno di questa correlazione tra i due seed è confermato nella maggior parte delle correlazioni, che risultano positive con aree nella stessa regione (frontale o posteriore) e negative con aree della regione opposta. Questo si riscontra anche nella analisi delle connessioni con le aree relative alle network DMN e frontoparietale. Come precedentemente accennato, negli adulti sia mPFC che pCC risultano positivamente correlate con il giro sopramarginale, il precuneo e il giro angolare, mentre risultano negativamente correlate con DLPFC. I nostri risultati mostrano la presenza di connessioni significative tra queste aree che sembrano indicare una predisposizione allo sviluppo delle reti di alto livello già in questo periodo prenatale. Il segno di queste correlazioni non è però corrispondente a quello riscontrato negli adulti. Nei nostri neonati prematuri sono state trovate connessioni positive di mPFC con giro angolare, giro sopramarginale e precuneo, aree che sono invece negativamente correlate con pCC. Inoltre si osserva una correlazione positiva di mPFC con DLPFC destra e una correlazione positiva di pCC con DLPFC sinistra. Si può ipotizzare che questo andamento del segno delle correlazioni sia guidato dalla negatività della connessione mPFC-pCC e che, una volta raggiunta la specificità funzionale delle aree, l'inversione del segno della correlazione tra i due seed (con l'integrazione delle due componenti del DMN in una sola rete) provochi una modifica nel segno di tutte queste correlazioni portandole alla configurazione adulta. Questa ipotesi risulta coerente anche rispetto ad alcuni risultati osservati da altri gruppi [Gao, 2013] sulla relazione del DMN con la rete attentiva dorsale, che negli adulti è negativamente correlata con il DMN. Nei neonati si osservava infatti un progressivo aumento della correlazione all'interno delle singole reti, mentre l'anticorrelazione tipica tra DMN e network attentivo diventava evidente solo tra

il primo e il secondo anno di età, in corrispondenza dello sviluppo di un'unica rete DMN integrata.

I risultati ottenuti nelle varie fasi dell'analisi ci hanno permesso di osservare come, all'interno della variabilità e della complessità delle relazioni tra aree e reti cerebrali, l'età del soggetto svolga un ruolo fondamentale. Infatti, in molte correlazioni singole e in tutte le reti è stata riscontrata una significativa relazione con l'età allo scan. Questo risultato indica che lo sviluppo delle correlazioni tra i seed e le aree delle network di alto livello siano strettamente dipendenti dall'età e in questa popolazione può essere strettamente ricondotto a due fattori principali: le modifiche anatomiche indotte dallo sviluppo e l'esperienza acquisita durante il periodo di vita.

In particolare, è interessante il fatto che la variabile relativa all'età allo scan risulti essere predittore significativo all'interno del modello di regressione formato dalle variabili SDS, sesso, età allo scan e giorni di vita. Questo significa che nei prematuri sani, nonostante ci siano diverse variabili (ex. sesso e SDS) che influenzano globalmente lo sviluppo anatomico del cervello, per lo sviluppo funzionale delle reti la variabile più importante è l'età allo scan. Una spiegazione a ciò può essere data dal fatto che le variazioni anatomiche e funzionali non avvengono in sincronia, ma siano caratterizzate da una latenza non descritta e non riscontrata dal modello in questione.

Conclusioni

Questo lavoro di tesi è stato incentrato sullo sviluppo di metodi avanzati per l'analisi di immagini RM in popolazioni pediatriche. Lo scopo principale dello studio ha riguardato l'implementazione di metodi per l'analisi delle immagini e dei segnali di risonanza in due particolari ambiti, la creazione di atlanti di normalità e la risonanza funzionale in Resting State.

La prima parte è stata dedicata allo sviluppo di un nuovo metodo per la generazione di atlanti di normalità in una popolazione pediatrica molto eterogenea, comprendente soggetti tra gli 0 e i 17 anni, e diverse pesature di immagini ad alto campo.

Questo obiettivo è derivato dal fatto che attualmente non è disponibile un atlante di immagini RM 3T multiparametrico che comprenda tutta la fascia di sviluppo pediatrico. Molto spesso i template vengono generati per esigenze particolari su popolazioni con caratteristiche molto specifiche o limitatamente a poche pesature di immagini RM. Di conseguenza, vengono sviluppate metodologie avanzate che possano essere utilizzate su pesature differenti (ex. T1, T2 e DTI) oppure per effettuare la campionatura della popolazione in sotto-gruppi omogenei e dipendenti dall'età dei soggetti, ma raramente i due obiettivi vanno di pari passo.

Il nostro progetto ha voluto creare degli atlanti che descrivano lo sviluppo mediante diverse pesature e che siano confrontabili fra di loro, quindi generati tramite l'applicazione dello stesso metodo. Nella creazione degli atlanti abbiamo voluto prendere in considerazione sia una popolazione molto eterogenea sia molteplici pesature di immagine (T1, T2, DTI), introducendo un alto numero di variabili. È stato quindi necessario sviluppare un metodo che tenesse in considerazione tutte le caratteristiche del campione, che fosse adattabile alle variazioni che intercorrono nelle immagini durante lo sviluppo cerebrale e allo stesso tempo che fosse consistente tra le diverse pesature. Il metodo implementato è basato su Free Form Deformation, perché questa tecnica ha permesso di stimare in maniera accurata le deformazioni per ogni campione da analizzare.

I punti di forza del metodo che abbiamo implementato sono prevalentemente tre: il primo è l'utilizzo della trasformazione media. Questa scelta è vantaggiosa sia rispetto

all'utilizzo di un singolo soggetto di riferimento sia rispetto all'utilizzo di un template preliminare generato sui propri dati. Nel primo caso infatti si avrebbe una dipendenza dal soggetto iniziale, in quanto la scelta di un soggetto o di un altro può portare a risultati molto diversi. Nel secondo caso, un template preliminare può essere utile a minimizzare gli effetti di dipendenza da un singolo riferimento, tuttavia necessita di un processo iterativo molto oneroso. Ad ogni iterazione vengono ricalcolate le trasformazioni di ogni soggetto sull'atlante fino al raggiungimento di un template ottimizzato. In questo modo, però, l'inserimento di soggetti aggiuntivi per aumentare la numerosità del campione richiede che il processo sia fatto ripartire dal principio. L'utilizzo della trasformazione media, come nel nostro caso, prevede invece che la trasformazione finale sia calcolata in un'unica iterazione, snellendo il processo. Questo avviene, come già spiegato, tramite il calcolo delle trasformazioni di ogni soggetto rispetto a tutti gli altri e permette quindi di creare un template che non sia dipendente da un singolo riferimento, ma che tenga conto simultaneamente delle differenze tra tutti i soggetti.

Il secondo punto di forza è rappresentato dai pesi gaussiani utilizzati nelle trasformazioni medie. A differenza di quanto sviluppato da altri, nel nostro lavoro la suddivisione dell'intero campione 0-17 anni è già effettuata secondo una ripartizione d'età predefinita, i pesi quindi non sono utilizzati per suddividere ulteriormente il campione in base all'età, bensì per migliorare il calcolo della trasformazione. In alcuni range di età, il campione è infatti caratterizzato da una variabilità intrinseca che può risultare abbastanza elevata. Per questo motivo, i pesi sono stati utilizzati in modo che la trasformazione media calcolata tenga in considerazione tutti i soggetti del campione e la loro variabilità, ma minimizzi gli effetti di distorsione introdotti dalla registrazione di un soggetto ad un riferimento molto differente. L'utilizzo di questa tecnica ha fornito risultati molto buoni perché ha permesso di sfruttare appieno tutto il campione a disposizione, valorizzando i singoli soggetti e la loro variabilità. Lo stesso vale per i pesi utilizzati nella creazione dei template, in cui si è voluto valorizzare i soggetti che si scostavano in maniera minore dal centro del range di età d'appartenenza, permettendo di generare un atlante che fosse il più possibile rappresentativo della fascia di età. Anche in questo caso è stato tenuto conto della variabilità all'interno del gruppo e, quando gli effetti introdotti dalla variabilità sono risultati relativamente forti, l'utilizzo dei pesi ha contribuito a contenere tali effetti.

Il terzo punto di forza del metodo è rappresentato dall'utilizzo di diverse pesature di immagine. La maggior parte dei gruppi che hanno effettuato atlanti longitudinali, hanno utilizzato una singola pesatura di immagine o al più T1 e T2. Al fine di generare dei riferimenti il più possibilmente completi, nel nostro studio abbiamo deciso di includere oltre a T1 e T2 anche una acquisizione DTI da cui generare la mappa relativa alla FA. La scelta delle pesature da includere è ricaduta su T1, T2 e DTI, per due motivi: 1) sono le tre pesature che vengono maggiormente utilizzate per la valutazione clinica in fase di sviluppo, di conseguenza hanno permesso l'utilizzo del protocollo di acquisizione senza modificare sensibilmente le procedure relative ai normali esami RM clinici; 2) sono le tre pesature che permettono di estrapolare il maggior numero di informazioni anatomiche e strutturali relative a tutte le fasi che compongono l'intero processo di sviluppo cerebrale nel periodo pediatrico. Le diverse immagini sono infatti in grado di mettere in risalto determinati tipi di informazione: la DTI ha permesso di visualizzare in forma molto precoce la organizzazione dei fasci di materia bianca. La pesatura in T2 e T1, hanno permesso di discriminare tra WM e GM, mettendo in risalto alcune fasi di sviluppo.

In questo lavoro siamo quindi stati in grado di generare un atlante che da un punto di vista metodologico è consistente attraverso le diverse fasce d'età e le diverse pesature di immagine, mentre da un punto di vista descrittivo è risultato completo, poiché, tramite il confronto delle tre pesature, ha permesso di seguire la progressione del processo di sviluppo dell'encefalo.

La seconda parte del progetto è stata dedicata allo sviluppo di un metodo di analisi di RS-fMRI che permettesse lo studio delle immagini e dei segnali BOLD a differenti livelli di correlazione, in particolare intra e inter network.

Negli ultimi anni, sono molti i gruppi che hanno iniziato ad approcciarsi a questa tecnica di acquisizione, soprattutto per i vantaggi che offre nella possibilità di studiare la funzionalità cerebrale su un alto numero di soggetti anche non collaboranti. Per questo motivo alcuni di questi hanno focalizzato la loro attenzione sull'età dello sviluppo ed in particolare hanno studiato le reti e le loro modificazioni nei primi due anni di vita e in popolazioni di neoanti prematuri.

Il nostro lavoro si è proposto di studiare molto approfonditamente le reti nei bambini nati prematuri, andando ad analizzare le modifiche a cui le network vengono sottoposte durante il periodo della prematurità. In particolare, abbiamo studiato le reti che a questa

età non risultano ancora sviluppate, la DMN e quelle neurocognitive, analizzando se vi siano dei parametri altamente correlati ad esse che permettono di predire l'andamento delle relazioni tra le aree appartenenti a queste reti. È stato quindi implementato un metodo che ha permesso di effettuare una analisi a più livelli, in cui, una volta scelti i seed per le network del DMN, vengono analizzate le correlazioni sul singolo soggetto e sull'intero gruppo ed infine vengono studiate le cross-correlazioni tra le aree appartenenti alla componente anteriore e posteriore del DMN e alle due reti neurocognitive e la relazione tra queste connessioni funzionali con i parametri di interesse. I risultati hanno permesso di individuare la presenza di correlazioni significative tra le due componenti del DMN e delle network cognitive e di constatare la loro stretta dipendenza dall'età allo scan. Dalla analisi sono risultate essere già presenti le reti sensoriali primarie (uditiva, visiva e motoria) e sono stati riscontrati pattern di correlazioni relative alla predisposizione delle reti di alto livello cognitivo. Uno dei risultati trovati ha portato a definire l'età allo scan come parametro predittore rispetto all'andamento delle correlazioni tra le aree. Questo può significare che nei prematuri sani, anatomia e funzionalità cerebrale sono influenzate da variabili un po' diverse. Lo sviluppo anatomico è influenzato da parametri quali SDS, età alla nascita e sesso, che in effetti vengono utilizzati nella clinica per la valutazione dei neonati pretermine. Lo sviluppo funzionale, invece, sembra essere maggiormente influenzato dall'età del neonato ed è caratterizzato da un ritardo temporale rispetto allo sviluppo anatomico. Tale ritardo varia a seconda del network considerato con una latenza maggiore per i network cognitivi e minore per quelli sensori-motori.

In questo lavoro l'analisi è stata portata a termine su una popolazione di neonati prematuri, perché studiare i meccanismi cerebrali in questi soggetti, dove la nascita avviene nel momento di massimo sviluppo delle connessioni talamo-corticali dell'encefalo, può aiutare a comprendere e predire gli effetti a lungo termine che in molti casi vengono riscontrati nei bambini e negli adulti nati prematuramente. Questo è particolarmente importante nei bambini prematuri che abbiano avuto lesioni o emorragie alla nascita, per valutare se il danno arrecato sia compensato dalla plasticità cerebrale durante l'infanzia, ma anche negli ex-prematuri. Infatti, i neonati prematuri, anche quando considerati sani, hanno una maggiore probabilità di sviluppare deficit cognitivi e comportamentali ed è importante studiarli in maniera longitudinale nel tempo, per verificare se rispetto ai nati a termine vi siano differenze nello sviluppo. Un

progetto futuro, prosecuzione naturale di questo, è lo studio di questi bambini pretermine sani nel tempo, per seguire il loro sviluppo in particolare in due momenti più critici: nel secondo anno di età, per lo studio delle funzioni sensori-motorie, e nell'età scolare, per seguire lo sviluppo delle capacità cognitive di ordine superiore e verificare l'emergenza di eventuali deficit. Un follow up di questo tipo è sicuramente interessante anche per valutare se, in fasi più avanzate di sviluppo, le variabili prese in esame dal nostro studio (SDS, età alla nascita, sesso) possano essere considerate fattori predittivi di sviluppo normale o anomalo nel tempo.

La RS-fMRI fornisce informazioni complementari rispetto a quelle che possono essere estrapolate dalle sequenze anatomiche (T1 e T2) e strutturali (DTI). L'utilizzo di questa tecnica, in aggiunta alle acquisizioni già effettuate per la generazione degli atlanti, permetterebbe di completare ulteriormente la descrizione del pattern di normalità nell'ambito dello studio dello sviluppo cerebrale. Un atlante che comprende informazioni anatomiche, strutturali e funzionali insieme sarebbe in grado di descrivere sotto ogni punto di vista l'intero percorso di sviluppo.

I metodi presentati in questa tesi e le informazioni ricavate dalla loro applicazione, su soggetti sani e patologici, potrebbero essere sfruttati per applicazioni in diversi campi, sia in ambito di ricerca sia in ambito clinico. Innanzitutto possono fornire un utile riferimento di normalità per definire e caratterizzare una malattia, tramite la valutazione di quanto le caratteristiche riscontrate nella patologia si discostano dal riferimento e dalla varianza fisiologica accettabile. Inoltre, dei validi riferimenti anatomico-funzionali possono essere utilizzati per la pianificazione di trattamenti chirurgici (ad esempio per epilessia o tumori), per valutare gli effetti di una terapia e, in ambito tecnologico, per lo studio e la progettazione di supporti ausiliari che sostituiscono o integrano processi sensoriali non completamente efficienti.

Un progetto futuro sarà quello di riuscire ad integrare completamente le due metodologie per la generazione di atlanti di normalità caratterizzati da dati anatomo-funzionali. Per fare questo, è necessario aumentare la numerosità del campione, con l'acquisizione di un maggior numero di soggetti. I risultati ottenuti, sia riguardo gli atlanti di normalità che riguardo i dati funzionali, hanno mostrato una accuratezza e una bontà elevata anche con un campione poco numeroso. Tuttavia, avere a disposizione una casistica maggiore permetterebbe di ottenere risultati statisticamente più consistenti

ed affidabili, nonché di effettuare un campionamento più fitto all'interno del range di età, aumentando l'omogeneità dei gruppi analizzati ed la risoluzione dei risultati ottenuti. Per ottenere un campione di dati il più possibile completo, sarebbe auspicabile aumentare la differenziazione del tipo di immagini e dati che vengono inseriti nell'atlante. Oltre alle immagini T1, T2 e DTI già parte dell'atlante presentato in questo lavoro, è nostra intenzione sfruttare al meglio ogni acquisizione per aggiungere nuovi dati. Oltre alle immagini RM T1, T2 e FA nelle diverse fasce d'età, verranno aggiunte le mappe tissutali (WM, GM e CSF) calcolate a partire dalle immagini anatomiche e le mappe di MD ottenute dalle immagini DTI. In seguito, sarà effettuata una parcellizzazione delle aree cerebrali divise per funzionalità su tutti gli intervalli di età. Inoltre, quando la numerosità del campione sarà sufficiente, potremo generare un atlante trattografico con i maggiori fasci cerebrali e la loro evoluzione durante tutto il periodo dello sviluppo. Come già accennato, utilizzando le immagini fMRI è auspicabile riuscire a generare i template relativi alle network funzionali: motoria, visiva, uditiva, attentiva, linguaggio, task-positive e DMN.

Infine, data la stretta relazione tra le variazioni anatomiche, strutturali e funzionali, sarebbe molto interessante riuscire a definire un modello globale di predizione che permetta di mettere in relazione anche altre variabili anatomiche e funzionali quali per esempio il volume delle mappe tissutali, lo spessore corticale, con lo sviluppo cerebrale.

Bibliografia

- Akiyama, L. F., et al. (2013). "Age-specific average head template for typically developing 6-month-old infants." PLoS One 8(9): e73821.
- Aljabar, P., et al. (2008). "Assessment of brain growth in early childhood using deformation-based morphometry." Neuroimage 39(1): 348-358.
- Altaye, M., et al. (2008). "Infant brain probability templates for MRI segmentation and normalization." Neuroimage 43(4): 721-730.
- Ashburner, J. (2007). "A fast diffeomorphic image registration algorithm." Neuroimage 38(1): 95-113.
- Baldoli, C., et al. (2015). "Maturation of preterm newborn brains: a fMRI-DTI study of auditory processing of linguistic stimuli and white matter development." Brain Struct Funct 220(6): 3733-3751.
- Barkovich, A. J. (1988). "Techniques and methods in pediatric magnetic resonance imaging." Semin Ultrasound CT MR 9(3): 186-191.
- Barkovich, A. J., et al. (1988). "Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T." Radiology 166(1 Pt 1): 173-180.
- Beckmann, C. F., et al. (2005). "Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1457): 1001-1013.
- Beckmann, C. F. and S. M. Smith (2004). "Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging." IEEE Trans Med Imaging 23(2): 137-152.
- Bertino, E., et al. (2010). "Postnatal growth of preterm infants: which reference charts?" Minerva Pediatr 62(3 Suppl 1): 71-74.
- Bertino, E., et al. (2010). "Neonatal anthropometric charts: the Italian neonatal study compared with other European studies." J Pediatr Gastroenterol Nutr 51(3): 353-361.
- Bhatia, K. K., et al. (2007). "Groupwise combined segmentation and registration for atlas construction." Med Image Comput Comput Assist Interv 10(Pt 1): 532-540.
- Bhatia, K. K. H., J.V. ; Puri, B.K. ; Edwards, A.D. ; Rueckert, D. (2004). Consistent groupwise non-rigid registration for atlas construction. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2004., IEEE.
- Biswal, B., et al. (1995). "Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI." Magn Reson Med 34(4): 537-541.
- Bloembergen, N., et al. (1947). "Nuclear magnetic relaxation." Nature 160(4066): 475.
- Bourgeois, J. P. (1997). "Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex." Acta Paediatr Suppl 422: 27-33.

- Brauer, J., et al. (2008). "Temporal dynamics of perisylvian activation during language processing in children and adults." *Neuroimage* 41(4): 1484-1492.
- Buckner, R. L., et al. (2008). "The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease." *Ann N Y Acad Sci* 1124: 1-38.
- Chai, X. J., et al. (2014). "Selective development of anticorrelated networks in the intrinsic functional organization of the human brain." *J Cogn Neurosci* 26(3): 501-513.
- Collins, D. L., et al. (1994). "Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space." *J Comput Assist Tomogr* 18(2): 192-205.
- Craddock, R. C., et al. (2009). "Disease state prediction from resting state functional connectivity." *Magn Reson Med* 62(6): 1619-1628.
- Damaraju, E., et al. (2014). "Functional connectivity in the developing brain: a longitudinal study from 4 to 9 months of age." *Neuroimage* 84: 169-180.
- Dehaene-Lambertz, G., et al. (2002). "Functional neuroimaging of speech perception in infants." *Science* 298(5600): 2013-2015.
- Dehaene-Lambertz, G., et al. (2006). "Nature and nurture in language acquisition: anatomical and functional brain-imaging studies in infants." *Trends Neurosci* 29(7): 367-373.
- Dehaene-Lambertz, G., et al. (2005). "Neural correlates of switching from auditory to speech perception." *Neuroimage* 24(1): 21-33.
- Ding, M., et al. (2000). "Short-window spectral analysis of cortical event-related potentials by adaptive multivariate autoregressive modeling: data preprocessing, model validation, and variability assessment." *Biol Cybern* 83(1): 35-45.
- Doria, V., et al. (2010). "Emergence of resting state networks in the preterm human brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(46): 20015-20020.
- Dubois, J., et al. (2014). "The early development of brain white matter: a review of imaging studies in fetuses, newborns and infants." *Neuroscience* 276: 48-71.
- Fair, D. A., et al. (2010). "Maturing thalamocortical functional connectivity across development." *Front Syst Neurosci* 4: 10.
- Fonov, V., et al. (2011). "Unbiased average age-appropriate atlases for pediatric studies." *Neuroimage* 54(1): 313-327.
- Fox, M. D. and M. E. Raichle (2007). "Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging." *Nat Rev Neurosci* 8(9): 700-711.
- Fox, M. D., et al. (2005). "The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27): 9673-9678.
- Fransson, P., et al. (2011). "The functional architecture of the infant brain as revealed by resting-state fMRI." *Cereb Cortex* 21(1): 145-154.
- Fransson, P., et al. (2013). "Early development of spatial patterns of power-law frequency scaling in FMRI resting-state and EEG data in the newborn brain." *Cereb Cortex* 23(3): 638-646.

- Fransson, P., et al. (2009). "Spontaneous brain activity in the newborn brain during natural sleep--an fMRI study in infants born at full term." *Pediatr Res* 66(3): 301-305.
- Fransson, P., et al. (2007). "Resting-state networks in the infant brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15531-15536.
- Friederici, A. D., et al. (2011). "Maturation of the language network: from inter- to intrahemispheric connectivities." *PLoS One* 6(6): e20726.
- Gao, W., et al. (2015). "Development of human brain cortical network architecture during infancy." *Brain Struct Funct* 220(2): 1173-1186.
- Gao, W., et al. (2011). "Temporal and spatial evolution of brain network topology during the first two years of life." *PLoS One* 6(9): e25278.
- Gao, W., et al. (2013). "The synchronization within and interaction between the default and dorsal attention networks in early infancy." *Cereb Cortex* 23(3): 594-603.
- Gao, W., et al. (2009). "Temporal and spatial development of axonal maturation and myelination of white matter in the developing brain." *AJNR Am J Neuroradiol* 30(2): 290-296.
- Gogtay, N., et al. (2004). "Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8174-8179.
- Greicius, M. D., et al. (2003). "Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 253-258.
- He, Y. and A. Evans (2010). "Graph theoretical modeling of brain connectivity." *Curr Opin Neurol* 23(4): 341-350.
- Holland, S. K., et al. (2007). "Functional MRI of language lateralization during development in children." *Int J Audiol* 46(9): 533-551.
- Huppi, P. S. and J. Dubois (2006). "Diffusion tensor imaging of brain development." *Semin Fetal Neonatal Med* 11(6): 489-497.
- Huttenlocher, P. R. (1979). "Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging." *Brain Res* 163(2): 195-205.
- Huttenlocher, P. R. and C. Bonnier (1991). "Effects of changes in the periphery on development of the corticospinal motor system in the rat." *Brain Res Dev Brain Res* 60(2): 253-260.
- Huttenlocher, P. R. and A. S. Dabholkar (1997). "Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex." *J Comp Neurol* 387(2): 167-178.
- Jelacic, S., et al. (2006). "Interactive digital MR atlas of the pediatric brain." *Radiographics* 26(2): 497-501.
- Jones, R. A., et al. (2004). "MRI of the neonatal brain: optimization of spin-echo parameters." *AJR Am J Roentgenol* 182(2): 367-372.
- Joshi, S., et al. (2004). "Unbiased diffeomorphic atlas construction for computational anatomy." *Neuroimage* 23 Suppl 1: S151-160.
- Kazemi, K., et al. (2007). "A neonatal atlas template for spatial normalization of whole-brain magnetic resonance images of newborns: preliminary results." *Neuroimage* 37(2): 463-473.

- Kim, D. J., et al. (2014). "Longer gestation is associated with more efficient brain networks in preadolescent children." *Neuroimage* 100: 619-627.
- Kinney, H. C., et al. (1988). "Sequence of central nervous system myelination in human infancy. II. Patterns of myelination in autopsied infants." *J Neuropathol Exp Neurol* 47(3): 217-234.
- Koch, W., et al. (2012). "Diagnostic power of default mode network resting state fMRI in the detection of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 33(3): 466-478.
- Koechlin, E., et al. (1999). "The role of the anterior prefrontal cortex in human cognition." *Nature* 399(6732): 148-151.
- Kuklisova-Murgasova, M., et al. (2011). "A dynamic 4D probabilistic atlas of the developing brain." *Neuroimage* 54(4): 2750-2763.
- Lauterbur, P. C. (1986). "NMR imaging in biomedicine." *Cell Biophys* 9(1-2): 211-214.
- Lauterbur, P. C. (1989). "Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973." *Clin Orthop Relat Res*(244): 3-6.
- Le Bihan, D., et al. (2001). "Diffusion tensor imaging: concepts and applications." *J Magn Reson Imaging* 13(4): 534-546.
- Le Bihan, D. B., E. (1985). "Imagerie de diffusion in vivo par résonance magnétique nucléaire." *C R Acad Sci Paris*: 1109-1112.
- Lee, S. W., G.; Shin, S.Y. (1997). *Scattered Data Interpolation with Multilevel B-Splines*.
- Liao, W., et al. (2011). "Small-world directed networks in the human brain: multivariate Granger causality analysis of resting-state fMRI." *Neuroimage* 54(4): 2683-2694.
- Lin, W., et al. (2008). "Functional connectivity MR imaging reveals cortical functional connectivity in the developing brain." *AJNR Am J Neuroradiol* 29(10): 1883-1889.
- Maes, F., et al. (1997). "Multimodality image registration by maximization of mutual information." *IEEE Trans Med Imaging* 16(2): 187-198.
- McConnell, S. K. (1989). "The determination of neuronal fate in the cerebral cortex." *Trends Neurosci* 12(9): 342-349.
- McConnell, S. K., et al. (1989). "Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex." *Science* 245(4921): 978-982.
- McGraw, P., et al. (2002). "Evaluation of normal age-related changes in anisotropy during infancy and childhood as shown by diffusion tensor imaging." *AJR Am J Roentgenol* 179(6): 1515-1522.
- McKinstry, R. C., et al. (2002). "Radial organization of developing preterm human cerebral cortex revealed by non-invasive water diffusion anisotropy MRI." *Cereb Cortex* 12(12): 1237-1243.
- Oishi, K., et al. (2011). "Multi-contrast human neonatal brain atlas: application to normal neonate development analysis." *Neuroimage* 56(1): 8-20.
- Parizel, P. M. v. d. H., L.; De Belder, F.; Van Goethem, J.; Venstermans, C.; Salgado, R.; Voormolen, M.; Van Hecke, W. (2010). *Magnetic Resonance Imaging of the*

Brain. Clinical MR Imaging: a Practical Approach. P. P. Reimer, P.M; Meaney, J.F.M.; Stichnoth, F.A.

- Partridge, S. C., et al. (2004). "Diffusion tensor imaging: serial quantitation of white matter tract maturity in premature newborns." *Neuroimage* 22(3): 1302-1314.
- Perani, D., et al. (2011). "Neural language networks at birth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(38): 16056-16061.
- Poduslo, S. E. and Y. Jang (1984). "Myelin development in infant brain." *Neurochem Res* 9(11): 1615-1626.
- Power, J. D., et al. (2010). "The development of human functional brain networks." *Neuron* 67(5): 735-748.
- Roebroek, A., et al. (2005). "Mapping directed influence over the brain using Granger causality and fMRI." *Neuroimage* 25(1): 230-242.
- Rosazza, C. and L. Minati (2011). "Resting-state brain networks: literature review and clinical applications." *Neurol Sci* 32(5): 773-785.
- Rueckert, D., et al. (2006). "Diffeomorphic registration using B-splines." *Med Image Comput Comput Assist Interv* 9(Pt 2): 702-709.
- Rueckert, D., et al. (1999). "Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images." *IEEE Trans Med Imaging* 18(8): 712-721.
- Sanchez, C. E., et al. (2012). "Age-specific MRI templates for pediatric neuroimaging." *Dev Neuropsychol* 37(5): 379-399.
- Sanchez, C. E., et al. (2012). "Neurodevelopmental MRI brain templates for children from 2 weeks to 4 years of age." *Dev Psychobiol* 54(1): 77-91.
- Saunders, D. E., et al. (2007). "Magnetic resonance imaging protocols for paediatric neuroradiology." *Pediatr Radiol* 37(8): 789-797.
- Schnabel, J. A. R., D.; Quist, M.; Blackall, J.M.; Castellano-Smith, A.D.; Hartkens, T.; Penney, G.P.; Hall, W.A.; Liu, H.; Truwit, C.L.; Gerritsen F.A.; Hill, D.L.G.; Hawkes, D.J. (2001). A Generic Framework for Non-rigid Registration Based on Non-uniform Multi-level Free-Form Deformations. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2001*.
- Seghers, D. D. A., E.; Maes, F.; Vandermeulen, D.; Suetens, P. (2004). Construction of a Brain Template from MR Images Using State-of-the-Art Registration and Segmentation Techniques. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention -- MICCAI 2004, 7th International Conference, Saint Malo, France*.
- Serag, A., et al. (2012). "Construction of a consistent high-definition spatio-temporal atlas of the developing brain using adaptive kernel regression." *Neuroimage* 59(3): 2255-2265.
- Shan, Z. Y., et al. (2006). "A digital pediatric brain structure atlas from T1-weighted MR images." *Med Image Comput Comput Assist Interv* 9(Pt 2): 332-339.
- Shi, F., et al. (2011). "Infant brain atlases from neonates to 1- and 2-year-olds." *PLoS One* 6(4): e18746.
- Smith, S. M. (2002). "Fast robust automated brain extraction." *Hum Brain Mapp* 17(3): 143-155.

- Smith, S. M., et al. (2012). "Temporally-independent functional modes of spontaneous brain activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8): 3131-3136.
- Smyser, C. D., et al. (2010). "Longitudinal analysis of neural network development in preterm infants." *Cereb Cortex* 20(12): 2852-2862.
- Smyser, C. D. and J. J. Neil (2015). "Use of resting-state functional MRI to study brain development and injury in neonates." *Semin Perinatol* 39(2): 130-140.
- Song, X. W., et al. (2011). "REST: a toolkit for resting-state functional magnetic resonance imaging data processing." *PLoS One* 6(9): e25031.
- Steen, R. G., et al. (1997). "Age-related changes in the pediatric brain: quantitative MR evidence of maturational changes during adolescence." *AJNR Am J Neuroradiol* 18(5): 819-828.
- Stiles, J. and T. L. Jernigan (2010). "The basics of brain development." *Neuropsychol Rev* 20(4): 327-348.
- Supekar, K., et al. (2010). "Development of functional and structural connectivity within the default mode network in young children." *Neuroimage* 52(1): 290-301.
- Tustison, N. J., et al. (2010). "N4ITK: improved N3 bias correction." *IEEE Trans Med Imaging* 29(6): 1310-1320.
- van den Heuvel, M. P., et al. (2015). "The Neonatal Connectome During Preterm Brain Development." *Cereb Cortex* 25(9): 3000-3013.
- van der Knaap, M. S. and J. Valk (1990). "MR imaging of the various stages of normal myelination during the first year of life." *Neuroradiology* 31(6): 459-470.
- Van Dijk, K. R., et al. (2010). "Intrinsic functional connectivity as a tool for human connectomics: theory, properties, and optimization." *J Neurophysiol* 103(1): 297-321.
- Vincent, D. J., et al. (2006). "The range of motor activation in the normal human cortex using bold fMRI." *Brain Topogr* 18(4): 273-280.
- Walhovd, K. B., et al. (2012). "Long-term influence of normal variation in neonatal characteristics on human brain development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(49): 20089-20094.
- Wang, J., et al. (2010). "Graph-based network analysis of resting-state functional MRI." *Front Syst Neurosci* 4: 16.
- Welker, K. M. and A. Patton (2012). "Assessment of normal myelination with magnetic resonance imaging." *Semin Neurol* 32(1): 15-28.
- White, T. P., et al. (2014). "Dysconnectivity of neurocognitive networks at rest in very-preterm born adults." *Neuroimage Clin* 4: 352-365.
- Wilke, M., et al. (2008). "Template-O-Matic: a toolbox for creating customized pediatric templates." *Neuroimage* 41(3): 903-913.
- Wylie, K. P., et al. (2014). "Reduced brain resting-state network specificity in infants compared with adults." *Neuropsychiatr Dis Treat* 10: 1349-1359.
- Xiao, Y., et al. (2015). "Longitudinal changes in resting-state fMRI from age 5 to age 6years covary with language development." *Neuroimage* 128: 116-124.
- Xiao, Y., et al. (2015). "The development of the intrinsic functional connectivity of default network subsystems from age 3 to 5." *Brain Imaging Behav*.

- Yoshida, S., et al. (2013). "Diffusion tensor imaging of normal brain development." *Pediatr Radiol* 43(1): 15-27.
- Yu, Q., et al. (2015). "Structural Development of Human Fetal and Preterm Brain Cortical Plate Based on Population-Averaged Templates." *Cereb Cortex*.