



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biomedicina e Neuroscienze
Coordinatore Ch.mo Prof. Giovanni Zummo
Indirizzo Neuroscienze e Disturbi del Comportamento
Referente Ch.ma Prof.ssa Carla Cannizzaro
Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche
Settore Scientifico Disciplinare MED/36

STUDIO DI SEGMENTAZIONE MORFOVOLUMETRICA IN PAZIENTI CON DECLINO COGNITIVO LIEVE, MALATTIA DI ALZHEIMER E MALATTIA DI PARKINSON

nell'ambito del progetto

*“STUDIO DELLE MALATTIE DEGENERATIVE DELL'INVECCHIAMENTO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE
MEDIANTE L'USO COMBINATO DI TENICHE DI RISONANZA MAGNETICA (RM) CONVENZIONALI ED
AVANZATE E CORRELAZIONE CON DATI CLINICO-NEUROLOGICI, NEURO-PSICOLOGICI E GENETICI”*

IL DOTTORE
DOTT. CESARE GAGLIARDO

IL COORDINATORE
PROF. GIOVANNI ZUMMO

IL TUTOR
DOTT. TOMMASO PICCOLI

IL REFERENTE
PROF.SSA CARLA CANNIZZARO

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

a Laura

*con la testa letteralmente sommersa
continuo a respirare bene solo grazie a te*

1 Indice

<u>1</u>	<u>INDICE</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>ANTEFATTO E RINGRAZIAMENTI</u>	<u>2</u>
<u>3</u>	<u>INTRODUZIONE</u>	<u>4</u>
<u>4</u>	<u>TECNICHE DI STUDIO</u>	<u>9</u>
4.1	<u>INDICI MORFOMETRICI E SCALE DI VALUTAZIONE DEL GRADO DI LEUCOARAIOSI</u>	<u>10</u>
4.2	<u>TECNICHE DI SEGMENTAZIONE ENCEFALICA (VOXEL-BASED MORPHOMETRY, VBM)</u>	<u>12</u>
4.3	<u>CENNI SULL'ANALISI DELLA VARIAZIONE DELLA DIFFUSIONE NON GAUSSIANA (DIFFUSION KURTOSIS IMAGING, DKI)</u>	<u>16</u>
4.4	<u>CENNI SULLE VARIAZIONI DI ANISOTROPIA FRAZIONATA VALUTATE MEDIANTE ANALISI TRACT-BASED SPATIAL STATISTICS (TBSS) DEL TENSORE DI DIFFUSIONE (DIFFUSION TENSOR IMAGING, DTI)</u>	<u>18</u>
<u>5</u>	<u>OBIETTIVI</u>	<u>20</u>
<u>6</u>	<u>MATERIALI E METODI</u>	<u>21</u>
<u>7</u>	<u>RISULTATI</u>	<u>26</u>
<u>8</u>	<u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	<u>30</u>
<u>9</u>	<u>ICONOGRAFIA</u>	<u>34</u>
<u>10</u>	<u>TABELLE</u>	<u>47</u>
<u>11</u>	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>50</u>

2 Antefatto e ringraziamenti

Nel corso del triennio 2012-2014 sono stati inizialmente ottimizzati, su volontari sani, i protocolli di studio RM secondo i dati disponibili in letteratura. Sono state inoltre ottenute le autorizzazioni per l'utilizzo di sequenze sperimentali con lo scanner RM GE Signa 1,5T HDxt utilizzato per lo svolgimento del progetto e sito presso la Sezione di Scienze Radiologiche dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo Diretta dal Prof. Massimo Midiri che ringrazio apertamente per la disponibilità e fiducia offerta. Con l'occasione ringrazio inoltre il Dott. Giuseppe La Tona, Responsabile dell'U.O. di Neuroradiologia e Radiologia Odontostomatologica e Maxillo-Facciale della Sezione di Scienze Radiologiche dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo per il supporto logistico. Con lo scanner RM di cui sopra, nel corso del primo anno, sono stati acquisiti gli esami di prova su volontari e su pazienti. Dalle prove effettuate, si è deciso di restringere il numero di tecniche RM da impiegare nel protocollo di studio così da ottimizzare al meglio i tempi medi di ciascuna sequenza (e conseguentemente dell'intero esame RM) soprattutto considerando la tipologia di soggetti previsti dallo studio.

I pazienti inclusi in questo studio sono stati selezionati e valutati clinicamente e con batteria cognitivo-comportamentale dal Dr. Roberto Monastero, Ricercatore Confermato di Neurologia che ringrazio sentitamente, responsabile dell'Ambulatorio Demenze, Disturbi di Memoria e Malattia di Parkinson dell'U.O.C di Neurologia e Neurofisiopatologia dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo (Direttore: Prof. Giovanni Savettieri fino al novembre 2014; ad oggi Prof.ssa Brigida Fierro).

Le analisi di segmentazione morfovolumetrica sono state eseguite presso la Sezione di Scienze Radiologiche dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo con il supporto degli assistenti in formazione della Scuola di Specializzazione in Diagnostica per Immagini Dott.ssa Giusi Alessi e Dott. Andrea Anastasi e il neo-laureato in Medicina e Chirurgia Dott. Riccardo Laudicella.

Le analisi statistiche di clustering gerarchico dei dati ottenuti sono state effettuate grazie alla preziosa collaborazione del Dott. Maurizio Marrale Ricercatore Confermato in Fisica presso il Dipartimento di Fisica e Chimica dell'Università degli Studi di Palermo. Oltre che al Dott. Marrale un sentito ringraziamento va alla Prof.ssa Brai e a tutti i collaboratori che afferiscono al suo laboratorio, con particolare riferimento al Dott. Giorgio Collura, per la vivace collaborazione instauratasi in questi anni.

Ultimi ringraziamenti, ma certamente non meno importanti, alla Prof.ssa Carla Cannizzaro, responsabile del Dottorato di Ricerca in Neuroscienze e Disturbi del Comportamento, e al Dott. Tommaso Piccoli, Ricercatore Confermato di Neurologia, mio tutor durante questo percorso.

A voi tutti i miei più sentiti ringraziamenti per quanto fatto e, soprattutto, per quanto ancora avremo certamente modo di fare.... ad majora!

Cesare

3 Introduzione

L'analisi per età della struttura della popolazione nazionale, secondo i dati pubblicati dal Sistema Statistico Nazionale (SiStaN) nell'annuario statistico italiano 2010, dimostra un trend in continuo aumento del grado d'invecchiamento della popolazione. L'indice di vecchiaia, il rapporto cioè tra la popolazione di 65 anni o più e quella con meno di 15 anni, è stato stimato intorno al 144%: questo dato pone il nostro Paese al secondo posto in Europa, quanto alla severità con cui si manifesta il processo di invecchiamento della popolazione. Questa trasformazione della struttura demografica della società è, e certamente continuerà a essere, responsabile di importanti implicazioni economiche e socio-sanitarie con un continuo aumento dei costi sanitari ed assistenziali, specie per i soggetti che necessitano di assistenza a lungo termine. Sebbene con l'avanzare dell'età diverse e spesso concomitanti patologie possano contribuire ad uno stato di salute instabile, l'invecchiamento cerebrale è un fattore determinante nella perdita dell'autosufficienza di un individuo, con le conseguenti severe ripercussioni cui si è già fatto riferimento.

Riuscire a definire i confini nosografici dell'invecchiamento cerebrale "fisiologico" (normal aging brain, NAB) da quadri con declino cognitivo lieve (mild cognitive impairment, MCI) o di esordio di una franca sindrome demenziale così da poter, quando possibile, intervenire prontamente per rallentare il progressivo declino delle funzioni cognitive, non è cosa semplice.

La demenza è una sindrome cerebrale organica caratterizzata da deterioramento progressivo delle capacità cognitive del soggetto tale da causare una

compromissione delle attività della vita quotidiana rispetto a un precedente livello di funzionamento. Visto il notevole incremento dell'età media delle popolazioni occidentali, la demenza, ed in particolare la malattia di Alzheimer (AD) che ne costituisce la forma clinico-patologica più frequente, rappresenta una vera emergenza sociale per i sistemi sanitari mondiali. Pertanto, nel corso degli ultimi due lustri si è cercato di identificare soggetti ad alto rischio di conversione in AD, i cosiddetti MCI.

L'MCI si caratterizza per una compromissione delle funzioni cognitive più lieve rispetto alla demenza ed a differenza di questa tale deficit può essere transitorio; di norma non sono presenti disturbi delle abilità funzionali nel soggetto con MCI. Quando l'MCI è caratterizzato dall'interessamento del dominio della memoria viene definito anamnestic (amnesic MCI, aMCI).

Alcuni Autori hanno ipotizzato un "continuum cognitivo" che va dall'invecchiamento normale alla demenza passando per una fase di MCI che rappresenterebbe quindi un confine critico attraversato irreversibilmente da quegli individui destinati a sviluppare una sindrome dementigena su base degenerativa. Il concetto di MCI è stato più recentemente adottato anche in riferimento a patologie, non puramente corticali, come la malattia di Parkinson (Parkinson's disease, PD). Infatti, sembra che i soggetti con PD ed MCI (PD-MCI), similmente ai soggetti con aMCI pre-AD, presentino un outcome prognostico negativo con notevole tendenza a divenire soggetti con demenza associata a PD rispetto i soggetti con PD senza MCI (PD-noMCI).

La valutazione di questi soggetti è oggi basata sostanzialmente sull'esame clinico-neurologico e sulla somministrazione di test neuro-psicologici mirati alla

valutazione di un'eventuale menomazione cognitiva; in questo contesto le tecniche di neuroimaging rappresentano un passo importante nell'iter diagnostico cui questi soggetti andranno incontro, consentendo tra l'altro di discriminare forme demenziali primarie da forme secondarie. Tra le tecniche di neuroimaging è la risonanza magnetica (RM) la tecnica oggi di riferimento per lo studio del sistema nervoso centrale, in vivo e con modalità non invasive (o comunque mini-invasive quando ad es. è prevista la somministrazione di un mezzo di contrasto esogeno). Le tecniche RM quotidianamente utilizzate in ambito clinico (conventional magnetic resonance imaging, cMRI), sebbene abbiano raggiunto dei livelli qualitativi molto elevati sia in termini di risoluzione spaziale che di contrasto, si limitano tuttavia a fornire informazioni riguardo la morfologia delle strutture studiate. Nel corso degli anni sono stati pubblicati diversi lavori in cui gli Autori correlano ad esempio la valutazione clinico-neurologica e neuropsicologica con il grado di atrofia (es: calcolo indici bi-frontale e bi-caudato) e/o di leucoaraiosi (in termini di WMH - "White Matter Hyperintensities" o ARWMC - "Age-Related White Matter Changes") valutati con cMRI.

Oggi, grazie all'utilizzo di apparecchiature ad alto campo (1,5T o più), è possibile eseguire degli studi di RM in grado di fornire informazioni non solo morfologiche ma anche funzionali ed ultrastrutturali: questa nuova dimensione dell'imaging in RM è da alcuni Autori definita come la quarta dimensione della diagnostica in RM. Protagonisti di questa rivoluzione sono, tra le altre, le tecniche di imaging di diffusione (diffusion weighted imaging, DWI), del tensore di diffusione (diffusion tensor imaging, DTI), di spettroscopia (magnetic resonance spectroscopy,

MRS), di perfusione (perfusion weighted imaging, PWI) e di attivazione corticale (blood oxygenation level dependent, BOLD). Con i moderni scanner RM è inoltre oggi possibile acquisire, in tempi relativamente bassi, sequenze morfologiche volumetriche di strato millimetrico (solitamente acquisite con voxel isotropico) dell'intero volume encefalico che ben si prestano a valutazioni quantitative grazie ad software di segmentazione dedicati.

Sebbene per la pratica clinica l'uso di scale di valutazione qualitative basate su tecniche RM convenzionali, sia diffusamente applicato e considerato sufficiente per una valutazione di massima del paziente, a scopo di ricerca l'uso di metodi quantitativi basati su tecniche di neuroimaging avanzate è chiaramente preferibile.

Queste nuove tecniche di imaging trovano da diversi anni ampia applicazione in ambito sperimentale ed oggi, grazie alla maggiore diffusione di apparecchiature ad alto campo ed ad una maggiore semplicità dei software per l'analisi dei dati così ottenuti, sono sempre più spesso eseguite routinariamente in ambito clinico ad integrazione dei protocolli di studio convenzionali anche in strutture la cui *mission* non sia necessariamente la ricerca scientifica.

La letteratura più recente è ricca di lavori in cui si sottolinea come l'utilizzo di queste tecniche avanzate di imaging RM contribuisca ad un aumento di sensibilità e specificità di uno studio RM. La maggior parte di questi lavori si limita tuttavia a confrontare una sola di queste tecniche avanzate con i risultati dell'analisi delle immagini ottenute con tecniche convenzionali e con i dati ottenuti dalla valutazione clinico-neurologica e neuro-psicologica; pochi sono i lavori in cui viene effettuato uno studio che includa più tecniche RM avanzate a causa della complessità delle

stesse e della difficoltà logistica di acquisire tali dati in pazienti anziani spesso poco collaboranti.

Considerato che l'atrofia è il principale indice di invecchiamento cerebrale (fisiologico o francamente patologico), in questo lavoro si è voluto indagare circa le eventuali correlazioni tra gli indici qualitativi di atrofia cortico-sottocorticale (bicaudate e bifrontal index), score per la valutazione del burden vascolare sottocorticale (scale di Fazekas e Whalund, per le white matter lesions) e indici quantitativi basati sui dati di segmentazione encefalica (Voxel Based Morphometry, VBM). Tali indici saranno correlati a parametri clinico-psicologici quali l'età, il sesso, la scolarità e a punteggi ottenuti in un test di funzionamento cognitivo globale (Mini-Mental State Examination, MMSE corretto), nonché a score di valutazione delle abilità funzionali di base (Activities of Daily Life, ADL) e strumentali (Instrumental Activities of Daily Life, IADL) della vita quotidiana.

4 Tecniche di studio

Segue breve descrizione degli indici qualitativi di atrofia cortico-sottocorticale, degli score per la valutazione del burden vascolare sottocorticale (leucoaraiosi), delle tecniche di segmentazione morfometrica (VBM) e delle sequenze RM avanzate ottimizzate ed utilizzate per questa fase del progetto.

4.1 Indici morfometrici e scale di valutazione del grado di leucoaraiosi

Come accennato, nella routine clinico-assistenziale è comune l'uso di scale di valutazione qualitativa che fanno riferimento a misurazioni effettuate sulle immagini delle sequenze RM convenzionali normalmente acquisite con i protocolli RM “standard”.

Queste scale prevedono la semplice acquisizione di misure lineari spesso considerate sufficienti per una valutazione di massima del paziente, anche se è stato dimostrato come la valutazione “ad occhio” da parte di un osservatore esperto è egualmente attendibile per esprimere un giudizio ad esempio sul grado del trofismo encefalico di un soggetto. Oggi metodi quantitativi basati su tecniche di neuroimaging avanzate sono chiaramente preferibili.

Gli indici morfometrici convenzionali comunemente utilizzati sono l'indice bicaudato (bicaudate ratio, BCr), pari al rapporto tra la larghezza dei due ventricoli laterali a livello della testa del nucleo caudato e la distanza tra i tavolati cranici interni allo stesso livello, e l'indice bifrontale (bifrontal index, BFi), pari al rapporto tra la massima larghezza dei corni frontali dei ventricoli laterali e la distanza tra i tavolati cranici interni allo stesso livello.

Le scale di valutazione qualitativa del grado di leucoencefalopatia su base vascolare cronica (leucoaraiosi) utilizzate più comunemente sono quelle di Fazekas e Wahlund.

Assegnazione punteggio scala di Fazekas (0 Nessuna lesione , I Grado, II Grado, III Grado):

- 0 = assenza lesioni
- I (grado lieve) = presenza di lesioni focali
- II (grado moderato) = presenza di lesioni tendenti alla confluenza
- III (grado severo) = diffuso interessamento con o senza interessamento delle u fibers

Le lesioni della sostanza bianca sono definite in RM come aree iperintense nelle immagini T2, PD e FLAIR, a contorni sfumati, del DT max di ≥ 5 mm e in TC come aree moderatamente ipodense, a contorni sfumati, del DT max di ≥ 5 mm.

Assegnazione punteggio scala di Whalund:

- lesioni della sostanza bianca sovratentoriale (white matter lesions score, WMLs) in base a sede (frontale, parieto-occipitale, temporale e infratentoriale; specificando il lato);
- lesioni dei nuclei della base (basal ganglia lesion score, BGLs) (specificando il lato).

Il punteggio totale secondo la scala di Whalund (max 30 punti) è dato dalla somma del WML score (max 24 punti) e del BGL score (max 6 punti).

I dati così ottenuti sono stati raccolti grazie ad una scheda appositamente realizzata e compilata al momento della stesura del referto dell'esame RM (vedi Figura 1).

4.2 Tecniche di segmentazione encefalica (Voxel-Based Morphometry, VBM)

Il software scelto per l'analisi VBM è il tool "sienax" del pacchetto FSL (Functional MRI of the Brain – FMRIB's Software Library – sviluppato dall'Analysis Group di Oxford, UK). Tale software è stato diffusamente usato in letteratura per analisi di questo tipo, è liberamente scaricabile ed è indipendente da librerie software a pagamento. È stata utilizzata l'ultima versione di FSL (v5.0.2) disponibile al momento in cui è iniziata l'analisi dei dataset RM acquisiti.

Sienax è un'evoluzione del tool "siena". Siena nasce dall'esigenza di eseguire una valutazione del cambiamento strutturale del cervello in grado di stimare l'atrofia cerebrale confrontando i dati di due esami RM di un medesimo paziente eseguiti in due diversi time-point (analisi longitudinale) valutando la percentuale di variazione del volume cerebrale (Percentage Brain Volume Change, PBVC). Fa uso di altri tool del pacchetto FSL per mettere a nudo il tessuto non cerebrale dai due dataset originali (Brain Extraction Tool, BET), registrare i due encefali così estratti (FMRIB's Linear Image Registration Tool, FLIRT) e analizzare le variazioni di volume encefalico tra i due time-point (FMRIB's Automated Segmentation Tool, FAST). È anche possibile proiettare le misure di atrofia così ottenute ad un livello "voxelwise" di uno spazio standardizzato utilizzato come template (in questo lavoro è stato utilizzato uno dei template realizzati dal Montreal Neurological Institute ed in particolare l'MNI125) in modo da consentire in analisi statistiche tra gruppi mirate a valutare ed evidenziare le differenze tra le diverse aree eloquenti cerebrali.

Sienax utilizza la medesima tecnica di analisi di siena ma consente di effettuare studi trasversali, lavorando quindi con un dataset RM di un paziente acquisito in un singolo time-point e fornisce dati quantitativi circa la volumetria encefalica (sostanza grigia, sostanza bianca e liquor cefalorachidiano) fornendo dati sia normalizzati secondo uno spazio standardizzato che non normalizzati.

Le analisi di segmentazioni sono state effettuate utilizzando le seguenti workstation: Apple Mac Pro mid 2012, Apple iMac 27" late 2013 ed occasionalmente un Apple MacBook 13" late 2009.

I dataset RM acquisiti sono stati convertiti in formato NIfTI compresso utilizzando il tool "dcm2nii" (liberamente scaricabile dall'indirizzo <<http://www.mcauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron/dcm2nii.html>>) abilitando le opzioni per il ritaglio e l'orientamento (rispettivamente "cropping" e "reorientation") dei dataset acquisiti.

I file così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di segmentazione utilizzando il tool sienax di FSL. In particolare sono state prima effettuate numerose segmentazioni di prova sia su dataset con volume noto (disponibili online e di libera consultazione) che sulle immagini acquisite su soggetti inclusi nello studio (volontari per acquisizioni *dummy run* ma anche su pazienti e controlli dello studio vero e proprio). Lo scopo di tali segmentazioni di prova è stato inizialmente quello di ottimizzare la risoluzione delle sequenze RM (spaziale e di contrasto) e, in seguito, quello di trovare la combinazione dei singoli parametri che conducesse ai risultati di segmentazione ottimali. In particolare si sono ottenuti i risultati migliori utilizzando i seguenti parametri ed opzioni per ciascuno dei tool utilizzati da sienax.

Tool BET:

- parametro “f” (soglia di intensità da applicare per l’estrazione del volume cerebrale da segmentare; compreso tra 0 e 1); il valore di “f” ottimale identificato è stato di 0.4 (valore di default 0.5);
- opzione di estrazione “S” (algoritmo utilizzato per ottimizzare la rimozione dei bulbi oculari e dei nervi ottici consigliato per il *workflow* siena/sienax);
- opzione di estrazione “B” (algoritmo utilizzato per ottimizzare la pulizia del campo di studio e la rimozione delle strutture anatomiche del collo);
- l’opzione “d” (*debug*) è sempre stata inoltre abilitata così da conservare i file di segmentazione intermedi utili per ricercare eventuali errori/imprecisioni nel processo di segmentazione.

Tool FAST:

- parametro “t” (pesatura immagine da analizzare: 1=T1, 2=T2, 3=PD); il si è sempre lavorato con sequenze T1 pesate;
- parametro “n” (numero di classi da segmentare; valore di default 3); si sempre lavorato con tre classi di segmentazione (grigia, bianca, liquor);
- parametro “H” (*Hyper*, regola il valore del filtro di smooting da applicare prima della segmentazione) valore utilizzato pari al valore di default (0.1);
- parametro “I” (regola numero di iterazioni durante il processo di estrazione e segmentazione); valore di default 4; valore utilizzato 2;
- parametro “l” (estensione in mm del filtro di smoothing); valore di default 20; valore utilizzato 5.

Esempio schematico dei risultati di segmentazione ottenuti sono riportati in Figura 2.

4.3 Cenni sull'analisi della variazione della diffusione non gaussiana (Diffusion Kurtosis Imaging, DKI)

L'analisi mediante RM del tensore di diffusione (Diffusion Tensor Imaging, DTI) consente di valutare anche in vivo e con modalità non invasive il processo di diffusione delle molecole d'acqua nei tessuti biologici.

La peculiare organizzazione di alcuni tessuti biologici (es: muscoli, sostanza bianca del sistema nervoso centrale, tessuti ad alta cellularità, etc etc...) influenza tale fenomeno rendendolo anisotropo e quindi ben valutabile con tali tecniche di studio. Variazioni dell'anisotropia tissutale possono inoltre essere riscontrate in numerose patologie.

Nonostante i grandi vantaggi di tale tecnica, la DTI è basata su un modello molto semplificato che assume che lo spostamento per diffusione segua un profilo gaussiano il che è molto raro in un ambiente variegato come i tessuti biologici. Per caratterizzare la natura non gaussiana della diffusione dell'acqua nei tessuti è stata sviluppata negli ultimi anni la Diffusion Kurtosis Imaging (DKI) che permette di ottenere ulteriori e più accurate informazioni sulle caratteristiche ultrastrutturali tissutali aggiungendo, a quella tridimensionale del tensore di diffusione (analisi di secondo livello in termini matematici), un'analisi del tensore di kurtosi (analisi di quarto livello) attraverso la contemporanea valutazione del fenomeno della diffusione utilizzando multipli valori di b (acquisizioni con "multi-b shields").

L'ottimizzazione delle sequenze utilizzate e la complessità dei software utilizzati per l'analisi delle sequenze DKI necessitano di una trattazione indipendente e sono state in parte affrontate in un altro lavoro già inviato - attualmente in revisione

(novembre 2014) - alla rivista “La Radiologia Medica” (Spinger, Official Journal of the Italian Society of Medical Radiology; Editor-in-Chief: Andrea Giovagnoni; ISSN: 1826-6983 / electronic version; Journal no. 11547; I.F. 1,368; articolo “PHYSICS, TECHNIQUES AND REVIEW OF NEURORADIOLOGICAL APPLICATIONS OF DIFFUSION KURTOSIS IMAGING (DKI)” di M. Marrale, Collura G., Brai M., Toschi N., Midiri F., La Tona G., Lo Casto A., Gagliardo C.).

4.4 Cenni sulle variazioni di Anisotropia Frazionata valutate mediante analisi Tract-Based Spatial Statistics (TBSS) del Tensore di Diffusione (Diffusion Tensor Imaging, DTI)

Recentemente si è assistito ad un crescente interesse nell'utilizzo delle tecniche di imaging di diffusione in RM per fornire informazioni sulla connettività anatomica nel cervello, misurando la diffusione anisotropa dell'acqua nei fasci di sostanza bianca.

Una delle misure più comunemente derivate da dati di diffusione in RM è l'anisotropia frazionaria (FA), in grado di esprimere una peculiare direzionalità di un fascio di fibre nervose. Molti studi stanno iniziando a usare le analisi dell'FA in modelli statistici “voxelwise”, al fine di localizzare i cambiamenti cerebrali legati ad esempio allo sviluppo del SNC nell'infanzia, piuttosto che ad una sua degenerazione fisiologica nel NAB o in casi di MCI o a seguito di una franca malattia. Tuttavia, ad oggi il più grosso limite è stato quello di non poter far riferimento ad un atlante di registrazione standardizzato per le mappe di FA estratte da sequenze DTI ; non è inoltre fino ad oggi stato trovato un algoritmo che consentisse un soddisfacente allineamento delle mappe di FA provenienti da più soggetti da sottoporre ad un'analisi “voxelwise”. Infine, l'arbitrarietà della scelta dei filtri di pre- e post-processing (smoothing in particolare) è ancora oggetto di discussione in letteratura.

La TBSS mira a risolvere questi problemi mediante l'ottimizzazione dell'algoritmo di registrazione non lineare cui viene fatta eseguire una proiezione dei dati registrati su di una mappa FA standardizzata che funge da “scheletro” (*template*) per la rappresentazione dei tratti di sostanza bianca. La TBSS mira quindi a

migliorare la sensibilità, l'obiettività e l'interpretabilità delle analisi di studi di imaging del tensore di diffusione (DTI) multi-soggetto. La complessità di tale analisi ha fatto sì che venisse rinviata ad una seconda fase del progetto l'analisi delle correlazioni dei dati di TBSS con i dati di altre sequenze di imaging RM (DKI e VBM in particolare), degli indici qualitativi morfometrici e con i dati quelli clinico-neuropsicologici.

5 Obiettivi

Il lavoro ha tra gli obiettivi primari:

- valutare il contributo offerto dalle tecniche di imaging RM avanzate rispetto al contributo offerto dalle sole tecniche di imaging RM convenzionali in soggetti con aMCI, AD, PD-MCI, PD-noMCI rispetto ai controlli sani;
- valutare e confrontare i risultati degli studi di segmentazione morfovolumetrica nei soggetti con aMCI, AD, PD-MCI, PD-noMCI rispetto ai controlli sani;
- valutare l'associazione fra dati clinico-neurologici e dati di neuroimaging nei soggetti con aMCI, AD, PD-MCI, PD-noMCI rispetto ai controlli sani.

Obiettivo secondario è di identificare, qualora possibile, dei valori soglia nei parametri calcolabili con le tecniche di neuroimaging avanzate che possano da una parte aumentare la sensibilità e la specificità dei criteri diagnostici clinici oggi disponibili e dall'altra condurre alla formulazione di protocolli diagnostici facilmente riproducibili su ampia scala con qualsiasi apparecchiatura RM ad alto campo, evitando sequenze avanzate che necessitano di laboriose fasi di post-processing e l'uso di software complessi non disponibili nella maggior parte delle strutture che non si occupano di ricerca così da poter eventualmente identificare un protocollo idoneo ad eventuali studi multicentrici.

6 Materiali e metodi

Sono stati sottoposti ad esame RM encefalo 103 soggetti (54♀ e 49♂) valutati nel corso del biennio 2013-2014 presso l'Ambulatorio Demenze, Disturbi di Memoria e Malattia di Parkinson dell'U.O.C di Neurologia e Neurofisiopatologia dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo (Direttore: Prof. Giovanni Savettieri fino al novembre 2014; ad oggi Prof.ssa Brigida Fierro). Il responsabile della selezione e valutazione sia clinica che mediante batteria cognitivo-comportamentale è stato il Dott. Roberto Monastero, già specialista in Neurologia e Ricercatore confermato presso questa A.O.U.P..

Sono stati valutati, confrontati e correlati con i dati clinici e neuro-psicologici gli indici morfometrici convenzionali (bicaudate index, bifrontal index, inner table, outer table), le scale qualitative di leucoaraiosi (Fazekas e Whalund) e le analisi di segmentazione encefalica (Voxel-Based Morphometry, VBM). Sono stati inoltre raccolti i dati per il futuro calcolo delle variazioni di anisotropia frazionata (Fractional Anisotropy, FA) mediante analisi TBSS (Tract-Based Spatial Statistics) del DTI (studio di connettività anatomica) e, su un sottogruppo di pazienti, i dati per un'analisi delle variazioni di diffusione kurtosica (Diffusion Kurtosis Imaging, DKI).

Per il raggiungimento di tali obiettivi i soggetti arruolati per lo studio sono stati sottoposti ad esame RM encefalo (scanner Signa HDxt da 1,5T General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI; bobina phase-array HD da 8 canali, dedicata per lo studio dell'encefalo) presso l'U.O. di Neuroradiologia e Radiologia Odontostomatologica e Maxillo-Facciale (Responsabile Dott. Giuseppe La Tona)

della Sezione di Scienze Radiologiche (Direttore Prof. Massimo Midiri) del Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi (Direttore Pro. Marcello Ciaccio) dell'A.O.U.P. Paolo Giaccone di Palermo dell'Università degli Studi di Palermo. Il sottogruppo di pazienti sottoposto ad esame RM con sequenze DKI è stato valutato utilizzando il secondo scanner RM della Sezione di Scienze Radiologiche (Achieva 1,5T Philips Medical Systems, Cleveland, OH, USA; bobina phase-array HD da 8 canali, dedicata per lo studio dell'encefalo).

Seguono le specifiche delle sequenze previste dal protocollo RM utilizzato:

- Sag 3D T2 Cube FLAIR fat sat (matrice 224x224; TR 6000ms; ET 125,621ms; IT 1864ms; FA 90; ETL 130; NEX 1; slice thickness 1,2mm; spacing 1,2mm; TA 6m32s);
- Sag 3D T1 FSPGR IR preped ASSET (matrice 256x256; TR 12.368ms; ET 5.088ms; IT 450ms; FA 90; ETL 1; NEX 1; slice thickness 1,2mm; spacing 0,6mm; TA 4m20s);
- Ax 2D FRFSE (matrice 384x224; TR 3750ms; ET 103,4ms; FA 90; ETL 15; NEX 2; slice thickness 5mm; spacing 6,5mm: TA 2m8s);
- Ax EPI-DWI (matrice 128x128; TR 7000ms; ET 96,8ms; FA 90; ETL 1; NEX 2; b=1000; slice thickness 5mm; spacing 6,5mm: TA 1m30s);
- Ax DTI (matrice 128x128; TR 8300ms; ET 102,2ms; FA 90; ETL 1; NEX 2; b=1000; 25 direzioni gradiente; slice thickness 5mm; spacing 5mm: TA 5m40s)
- Ax 3D SWAN (matrice 288x224; TR 78,5ms; ET 47,636ms; FA 15; ETL 10; NEX 0,69454; slice thickness 3mm; spacing 1,5mm: TA 5m20s).

Le sequenze morfologiche convenzionali sono state acquisite anche con il fine da una parte di fornire una relazione completa dell'esame RM al soggetto e dall'altra di escludere eventuali reperti accessori.

Le sequenze morfologiche convenzionali a TR lungo sono state utilizzate per l'assegnazione dei punteggi delle scale qualitative di Fazekas e Whalund così da escludere i quadri RM con segni di leucoencefalopatia su base vascolare cronica (leucoaraiosi) di grado moderato-severo o francamente severo.

Le sequenze EPI-DWI sono state utilizzate per escludere eventuali lesioni ischemiche recenti o altri reperti occasionali.

Le sequenze SWAN sono state acquisite in sostituzione delle convenzionali sequenze GRE-T2* per l'identificazione di eventuali segni di pregressi micro- e/o macro-sanguinamenti.

Per i casi selezionati sono stati utilizzati i criteri diagnostici in atto adottati negli studi internazionali di settore. In breve:

- aMCI - Punteggio patologico (sotto al cut-off normalità) in almeno un test per la memoria e con performance normali e/o patologiche in test non mnestici. Tutte le diagnosi di MCI erano in accordo con i seguenti criteri (Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO et al.: Mild cognitive impairment - beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. J Intern Med 2004; 256: 240-246): a) il declino cognitivo può essere rappresentato anche soltanto da un peggioramento rispetto ad un livello precedentemente più alto; b) assenza di compromissione nelle ADL

conseguente al deficit cognitivo ed eventuale lieve compromissione nelle IADL; c) Clinical Dementia Rating score = 0.5 (Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1994;44:1983-1984); d) assenza di demenza secondo i criteri del DSM-IV (American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, ed IV. Washington, American Psychiatric Association, 1994);

- AD - Tutti i soggetti inclusi sono stati diagnosticati come affetti da demenza in base ai criteri DSM-IV (vedi punto precedente). La diagnosi di AD probabile è stata effettuata in base ai criteri di McKhann G (McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-944);
- PD - I soggetti sono stati diagnosticati in PD base ai criteri dalla UK PD Society Brain Bank (Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ (1993) A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 50:140-148).
- PD-MCI - La classificazione del PD-MCI è stata effettuata includendo soggetti con amnestic e non amnestic PD-MCI, utilizzando i criteri di Winblad et al, come già descritto per l'aMCI.

Per lo studio sono state utilizzate le seguenti covariate: sesso, la scolarizzazione (anni), il punteggio corretto al MMSE (Mini-Mental State Examination), gli indici ADL (Activities of Daily Living) e IADL (Instrumental Activities of Daily Living).

I risultati di segmentazione ottenuti sono stati valutati in termini di valori medi e deviazioni standard mediante applicazione del t-test tra casi vs controlli; è stata, inoltre, effettuata un'analisi multivariata non esclusiva dei gruppi (cluster analysis) mediante l'applicazione di un clustering gerarchico (algoritmo agglomerativo) con rappresentazione gerarchica ad albero (dendogrammi). I risultati di segmentazione ottenuti sono stati valutati in termini di valori medi e deviazioni standard mediante t test tra pazienti vs controlli ed è inoltre stata effettuata un'analisi multivariata non esclusiva dei gruppi (cluster analysis) mediante l'applicazione di un clustering gerarchico (algoritmo agglomerativo) con rappresentazione gerarchica ad albero (dendogrammi).

7 Risultati

Dei 103 soggetti (45♂ e 41♀) originariamente inclusi nello studio e sottoposti tra gli altri ad esame RM encefalo, a seguito dell'analisi delle immagini RM ottenute, la popolazione di studio su cui sono state effettuate le analisi statistiche si è ridotta a 58 soggetti (27♂ e 31♀; età media 72,95 / range 61-85 / dev. stand. 6,66).

Sono stati infatti esclusi dallo studio 45 pazienti; in particolare sono stati esclusi: pazienti i cui dataset RM risultavano essere incompleti a causa della precoce interruzione dell'esame per mancata collaborazione dei pazienti (n=16) o in cui fossero presenti artefatti da movimento da scarsa collaborazione o altri artefatti quali quelli da protesi metalliche fisse alle arcate dentarie che potessero inficiare il risultato delle analisi di segmentazione morfovolumetrica (n=10), pazienti con segni di severa leucoencefalopatia su base vascolare cronica (n=8), pazienti con franchi esiti di pregressi ictus cerebrali ischemici o emorragici (n=4), pazienti con microsanguinamenti multipli con distribuzione cortico-sottocorticale come da angiopatia amiloidea (n=3), pazienti con lesioni ischemiche recenti subcliniche (n=2) e pazienti con emosiderosi superficiale da pregressa emorragia subaracnoidea (n=2). Alcuni esempi di pazienti esclusi dallo studio sono riportati nelle figure 3, 4, 5 e 6.

Le caratteristiche della popolazione definitiva comprensive di diagnosi, sesso, indice di scolarizzazione, numero di ADL/IADL ed MMSE corretto sono riportate in Tabella 1. Il ridotto numero di pazienti con PD-noMCI e PD-MCI nella popolazione di studio definitiva ha imposto che questi fossero esclusi dalle analisi statistiche.

Le medie con le rispettive deviazioni standard dei parametri valutati nella popolazione studiata sono riportate nei grafici delle figure 7, 8 e 9.

Le medie con le rispettive deviazioni standard dei risultati di segmentazione con il tool sienax (valori sia normalizzati che non normalizzati) sono riportati nei grafici delle figure 10 e 11.

I risultati del test t di student a due code ($\alpha=0.05$) sono riportati nelle tabelle 2 e 3 (rispettivamente per i dati di segmentazione normalizzati e non normalizzati).

Da questi risultati è emerso:

- significativa differenza tra pazienti AD e controlli nei dati di segmentazione della sostanza grigia norm. ($p=0.002$) e non norm. ($p=0.004$) e nei dati di segmentazione della volumetria encefalica globale norm. ($p=0.004$) e non norm. ($p=0.03$);
- significativa differenza tra pazienti aMCI e AD nei dati di segmentazione della sostanza grigia norm. ($p=0.005$) e non norm. ($p=0.01$) e nei dati di segmentazione della volumetria encefalica globale norm. ($p=0.004$);
- differenze non statisticamente significative sono state riscontrate tra aMCI e AD nei dati di segmentazione della volumetria encefalica globale non norm. ($p=0.07$);
- non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra aMCI e controlli sia nei dati di segmentazione norm. (st. grigia $p=0.4$; st. bianca $p=0.9$; vol. globale $p=0.5$) che non norm. (st. grigia $p=0.4$; st. bianca $p=0.3$; vol. globale $p=0.5$);

- differenze non statisticamente significative sono state riscontrate nei dati di segmentazione della sostanza bianca in tutti i gruppi esaminati (dati norm.: AD vs controlli $p=0.5$; aMCI vs controlli $p=0.9$; AD vs aMCI $p=0.3$; dati non norm.: AD vs controlli $p=0.3$; aMCI vs controlli $p=0.3$; AD vs aMCI $p=0.3$).

Le figure 12, 13 e 14 riportano i dendogrammi dell'analisi di clustering gerarchico (Hierarchical Clustering, HC).

L'analisi mediante clustering gerarchico eseguita sia scorporando i dati sienax normalizzati da quelli non normalizzati e riducendo il numero di parametri inclusi nell'analisi (punteggi totali scale di Fazekas e Whalund, MMSE corretto, età, BFi, BCr, educazione e ADL/IADL), ha evidenziato:

- buona correlazione tra i dati di segmentazione normalizzati e il valore di MMSE nei pazienti con AD, con buona correlazione tra gli indici di Fazekas e Whalund, tra BCr e BFi, e tra ADL e IADL;
- più modesta correlazione tra i dati di segmentazione normalizzati i parametri clinico-psicologici nei pazienti con MCI dove analogamente al gruppo precedente si riscontrano forte correlazioni tra ADL e IAD, Fazekas e Whalund, BFi e BCr e con forte correlazione tra scolarizzazione ed MMSE;
- nel gruppo dei controlli si è evidenziata una forte correlazione tra i dati di segmentazione normalizzati e il grado di scolarizzazione e modesta correlazione tra questi e gli altri indici valutati.

L'analisi mediante clustering gerarchico eseguita includendo tra i cluster tutti parametri raccolti (dati sienax sia normalizzati che non normalizzati, punteggio scala di Fazekas, punteggi parziali e totali scala di Whalund, età, MMSE corretto, indice bifrontale, indice bicaudato, ADL, IADL) rispettivamente sui controlli, sui pazienti AD e sui pazienti aMCI, non ha evidenziato particolari pattern di elevata correlazione tra i parametri esaminati (figura 14).

8 Discussione e conclusioni

In questo lavoro, che è parte di un progetto ben più ampio, ci si è focalizzati sul ruolo delle analisi di segmentazione morfovolumetrica encefalica come strumento di analisi del grado di atrofia cerebrale di pazienti con AD e aMCI rispetto ad un gruppo di controllo.

Tali tecniche di analisi sono da qualche anno utilizzate con successo sia in studi trasversali che longitudinali per monitorare rispettivamente il grado di atrofia o l'evoluzione della stessa in numerose patologie neurodegenerative.

I software oggi disponibili per tali analisi, sebbene già ottimizzati dagli sviluppatori e dai gruppi di ricerca che ne hanno fatto uso nel corso degli ultimi anni, richiedono troppo spesso delle conoscenze che esulano dal mondo medico per rientrare nel mondo dell'ingegneria informatica, della fisica e della matematica. Di contro numerosi fasi di dette analisi e i risultati stessi necessitano la valutazione manuale da parte di un occhio esperto, addestrato alla valutazione ed interpretazione di immagini sezionali. Per questi motivi, ad oggi, è auspicabile che tali analisi vengano condotte da gruppi eterogenei di specialisti con competenze diverse che insieme potranno concorrere al raggiungimento dell'obiettivo finale.

In questa fase del progetto sono state utilizzate esclusivamente sequenze volumetriche T1 pesate per le analisi di segmentazione morfovolumetrica poiché al momento dell'inizio della raccolta dei dati non era possibile acquisire sequenze volumetriche T2 pesate con lo scanner RM utilizzato. L'uso combinato di sequenze T1 e T2 pesate, già previsto per le future acquisizioni, potrà consentire di effettuare

inoltre un'analisi quantitativa automatizzata del burden vascolare sottocorticale. Ci si augura inoltre che in un imminente futuro nei software di segmentazione morfovolumetrica venga implementata la possibilità di utilizzare le sequenze T2 FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) per la valutazione automatica delle aree di sofferenza parenchimale su base vascolare cronica.

I dati ottenuti in questo studio sono in linea con quanto presente in letteratura ed evidenziano una maggiore atrofia cerebrale nei soggetti con AD rispetto ai controlli sani e rispetto ai soggetti con aMCI a conferma di come il grado di atrofia nei soggetti con AD correli fortemente con il declino cognitivo. Anche il riscontro di una scarsa significatività statistica nelle differenze tra i valori di segmentazione della sostanza bianca tra AD, aMCI e controlli è da considerarsi un dato in linea con i dati presenti in letteratura: trattandosi di quadri neurologici ad elettivo interessamento corticale non ci si aspettava di trovare significative differenze nel volume di sostanza bianca.

Anche il riscontro di una scarsa significatività tra i risultati delle analisi VBM tra aMCI e controlli è in linea con quanto presente in letteratura. A differenza infatti di quanto accade nei soggetti con AD, in cui già alla valutazione mediante sequenze RM convenzionali sia spesso possibile identificare segni di atrofia corticale più o meno marcati specie in sede fronto-temporale (con particolare riferimento al lobo temporale mesiale), nei soggetti con MCI la valutazione mediante esame RM evidenzia solitamente un quadro nei limiti della norma (con segni di invecchiamento cerebrale età correlati). Il risultato delle analisi VBM ci spinge ad ipotizzare un ruolo cruciale delle tecniche di analisi più avanzate (vedi DTI, TBSS e DKI) in grado di

valutare alterazioni ultrastrutturali non apprezzabili con la sola analisi morfovolumetrica.

Sebbene questo risultato sia già da considerarsi un successo, specie considerato il contesto in cui è stato ottenuto, esso rappresenta solo primo traguardo di un percorso ben più lungo. In futuro saranno innanzitutto reclutati un numero sufficiente di altri pazienti con PD (con e senza MCI) da integrare ai dati già raccolti ed indagare circa eventuali correlazioni tra un quadro neurodegenerativo tipicamente corticale quale l'AD ed una patologia tipicamente sottocorticale come il PD.

Si è inoltre già iniziato a reclutare nuovamente i pazienti sottoposti ad un primo esame RM così da poter effettuare un confronto dei dati RM e clinico-psicologici in uno studio longitudinale.

L'esiguo numero di soggetti inclusi nelle analisi definitive non consente tuttavia di esprimersi circa eventuali valori soglia in grado di discriminare una patologia da un'altra in base ai soli dati di segmentazione come previsto dall'end point secondario del lavoro.

Tra le prospettive future vi sono inoltre quella di correlare i dati di VMB raccolti con i dati TBSS effettuando però un'analisi di segmentazione che tenga conto però delle differenze volumetriche delle singole aree eloquenti (così da avere una precisa rappresentazione da una parte del trofismo encefalico area eloquente per area eloquente e dall'altra della connettività anatomica espressa in termini di FA).

In futuro saranno inoltre utilizzate le sequenze DKI come ulteriore strumento di studio di un sottogruppo di questi pazienti per indagare alterazioni ultrastrutturali non apprezzabili con sequenze DTI convenzionali.

In conclusione preme ricordare di come questo lavoro rappresenti la prima esperienza di segmentazione morfovolumetrica encefalica maturata e sviluppata interamente presso la Sezione di Scienze Radiologiche dell’A.O.U.P. P. Giaccone di Palermo. Dai dati in letteratura, questa sembrerebbe essere inoltre la prima esperienza di segmentazione morfovolumetrica encefalica che sia mai stata portata avanti a livello regionale. Le difficoltà incontrate nel finalizzare questa prima fase di un progetto ben più ambizioso, sono state solo in parte dovute alle difficoltà intrinseche nel portare avanti una tipologia di analisi del tutto nuova allo sperimentatore. Riuscire a ottenere gli spazi e i tempi dovuti, in un contesto stranamente non sempre in linea con la *mission* di una struttura ibrida, ospedaliera-universitaria, ha enormemente influito e pesato, nella gestione, crescita e avanzamento del progetto stesso.

Di contro, come fortunatamente spesso accade a “chi la dura”, le difficoltà non sono state sufficienti ad impedire il raggiungimento di questo primo traguardo. Di tutto questo i meriti vanno senz’altro anche al nutrito gruppo di collaboratori che, strada facendo, hanno sinergicamente e inesorabilmente contribuito all’avanzamento dei lavori e cui vanno ancora una volta i miei ringraziamenti.

9 Iconografia

Paziente: _____ **Data di nascita:** __/__/____
Esame valutato: TC RM **Data esame:** __/__/____

1) Indice di Fazekas

0 Nessuna lesione I Grado II Grado III Grado

Assegnazione punteggio:

- 0 = assenza lesioni
- I (lieve) = presenza di lesioni focali
- II (moderato) = presenza di lesioni tendenti alla confluenza
- III (severo) = diffuso interessamento con o senza interessamento delle *u fibers*

Le lesioni della sostanza bianca sono definite in RM come aree iperintense, non ben definite, del DT max di ≥ 5 mm nelle immagini T2, PD e FLAIR e in TC come aree moderatamente ipodense, non ben definite, del DT max di ≥ 5 mm.

2) Scala di Wahlund

2a) Lesioni della sostanza bianca (score WML):

Sede	Frontale		Parieto-Occipitale		Temporale		Infratentoriale	
	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN
Punteggio								

Assegnazione punteggio:

- 0 = assenza lesioni
- 1 = presenza di lesioni focali
- 2 = presenza di lesioni tendenti alla confluenza
- 3 = diffuso interessamento con o senza interessamento delle *u fibers*

Le lesioni della sostanza bianca sono definite in RM come aree iperintense, non ben definite, del DT max di ≥ 5 mm nelle immagini T2, PD e FLAIR e in TC come aree moderatamente ipodense, non ben definite, del DT max di ≥ 5 mm.

2b) Lesioni dei nuclei della base (score BGL):

Sede	DX	SN
Punteggio		

Assegnazione punteggio:

- 0 = assenza lesioni
- 1 = presenza di 1 lesione focale (DT max ≥ 5 mm)
- 2 = presenza di più di una lesione focale
- 3 = presenza di lesioni confluenti

2c) Calcolo del punteggio totale (total score):

Score WML = __ (max 24)	Score BGL = __ (max 6)
Totale = Score WML + Score BGL = __ (max 30)	

3) Indici misurazione grado di atrofia

Dove effettuare le misurazioni:

- FH (Frontal Horn) = diametro bifrontale (da misurare nel punto di massima distanza tra i corni temporali dei ventricoli laterali); a questo livello;
- CC (Caudate - Caudate) = diametro bicaudato (da valutare nel punto in cui le teste dei nuclei caudati determinano la massima impronta sulla parete dei ventricoli laterali);
- a questi livelli la distanza tra le superficie esterne del tavolato cranico rappresenta l'indice OT_{cc} (da Outer Table) mentre quella tra le superfici interne rappresenta l'indice IT_{cc} (da Inner Table);

Indici da calcolare:

- CC/OT_{cc} = indice bicaudato;
- FH/CC = rapporto tra diametro bifrontale e diametro bicaudato.

Indice	CC	FH	OT _{cc}	IT _{cc}	CC/OT _{cc}	FH/CC
Valore (in mm)						

Risultati analisi segmentazione con FLS (sienax):

Tessuto	Volume	unnormalised-volume
GREY		
WHITE		
BRAIN		

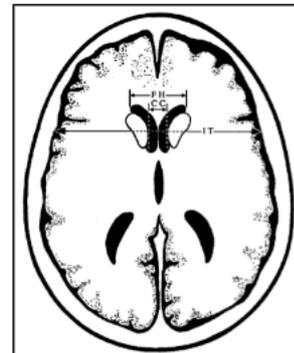


Figura 1 Scheda raccolta dati paziente.

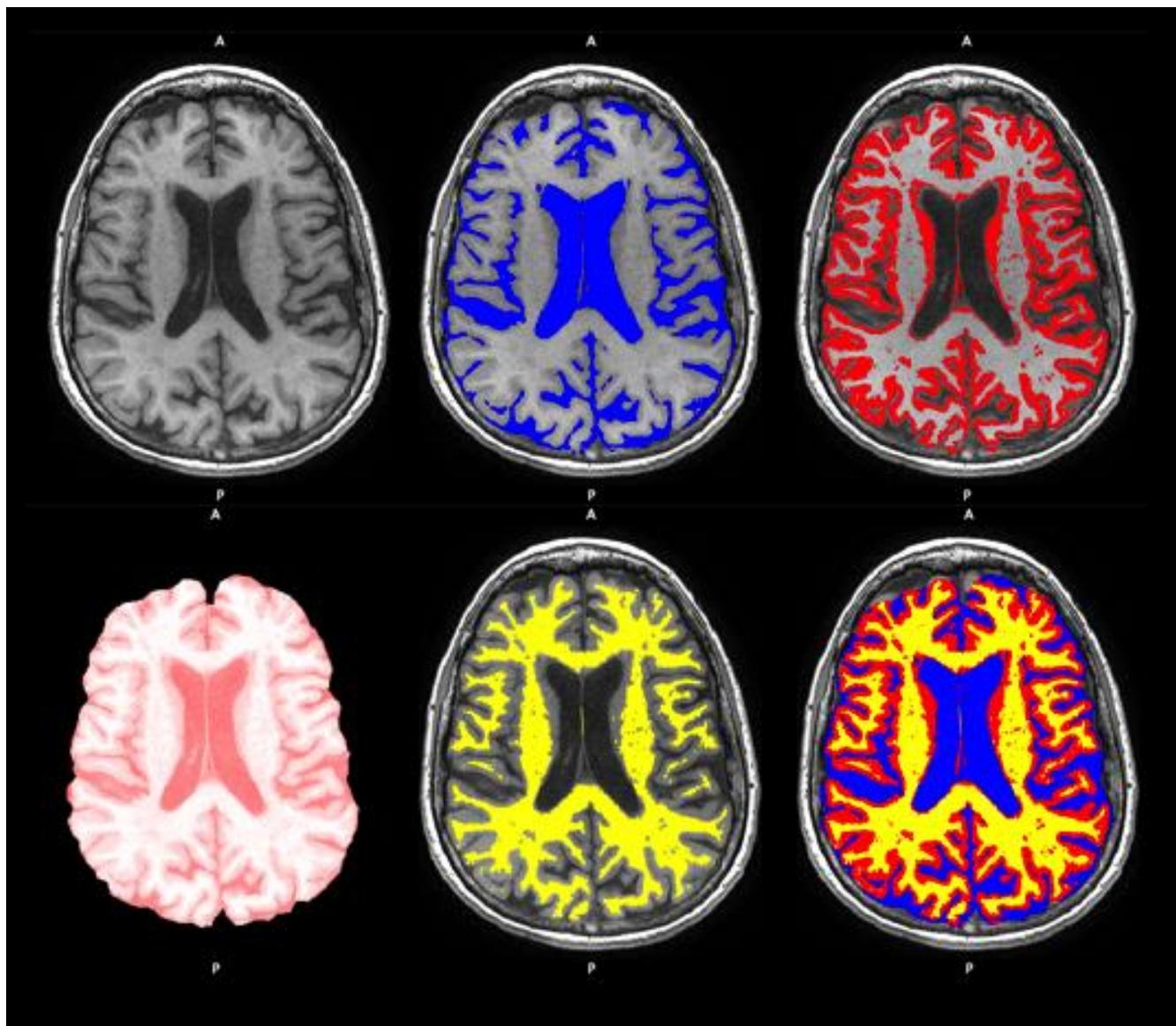


Figura 2 Esempi risultati analisi VBM; ricostruzione multiplanare (Multi-Planar Reconstruction, MPR) sul piano assiale della sequenza volumetrica T1 usata per lo studio VBM (in alto a sinistra), fusione con i dati di segmentazione del liquor in blu (in altro al centro), della sostanza grigia in rosso (in alto a destra), della sostanza bianca in giallo (in basso al centro) e tutte e tre le componenti (in basso a destra). In basso a sinistra (in rosa) il risultato del processo di estrazione cerebrale (BET).

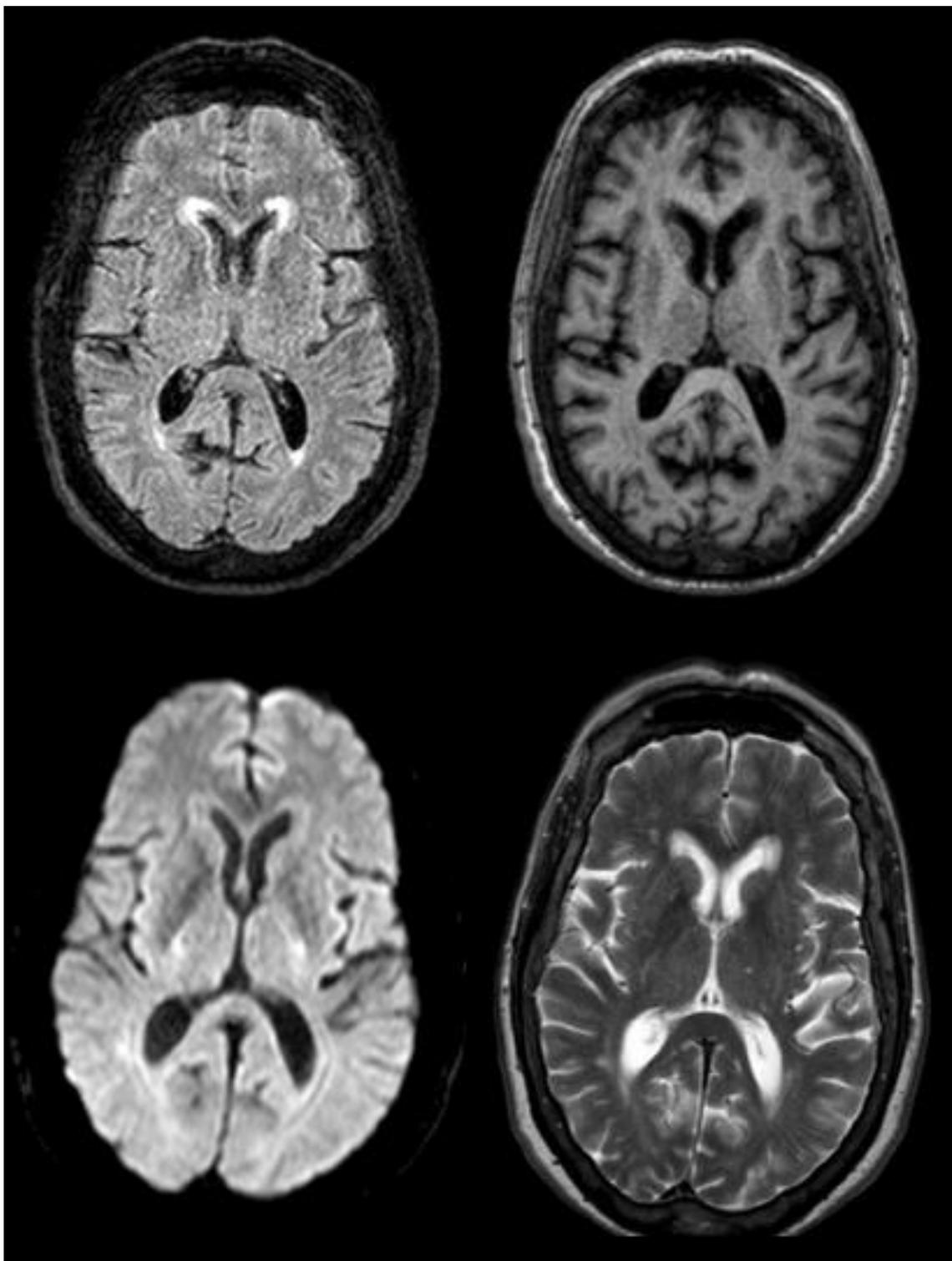


Figura 3 Esempio paziente escluso dallo studio a causa della presenza di artefatti da movimento apprezzabili nelle sequenze 3D FLAIR T2 e 3D SPGR T1 (riga in alto); ben valutabili le sequenze convenzionali EPI-DWI e TSE T2 (riga in basso).

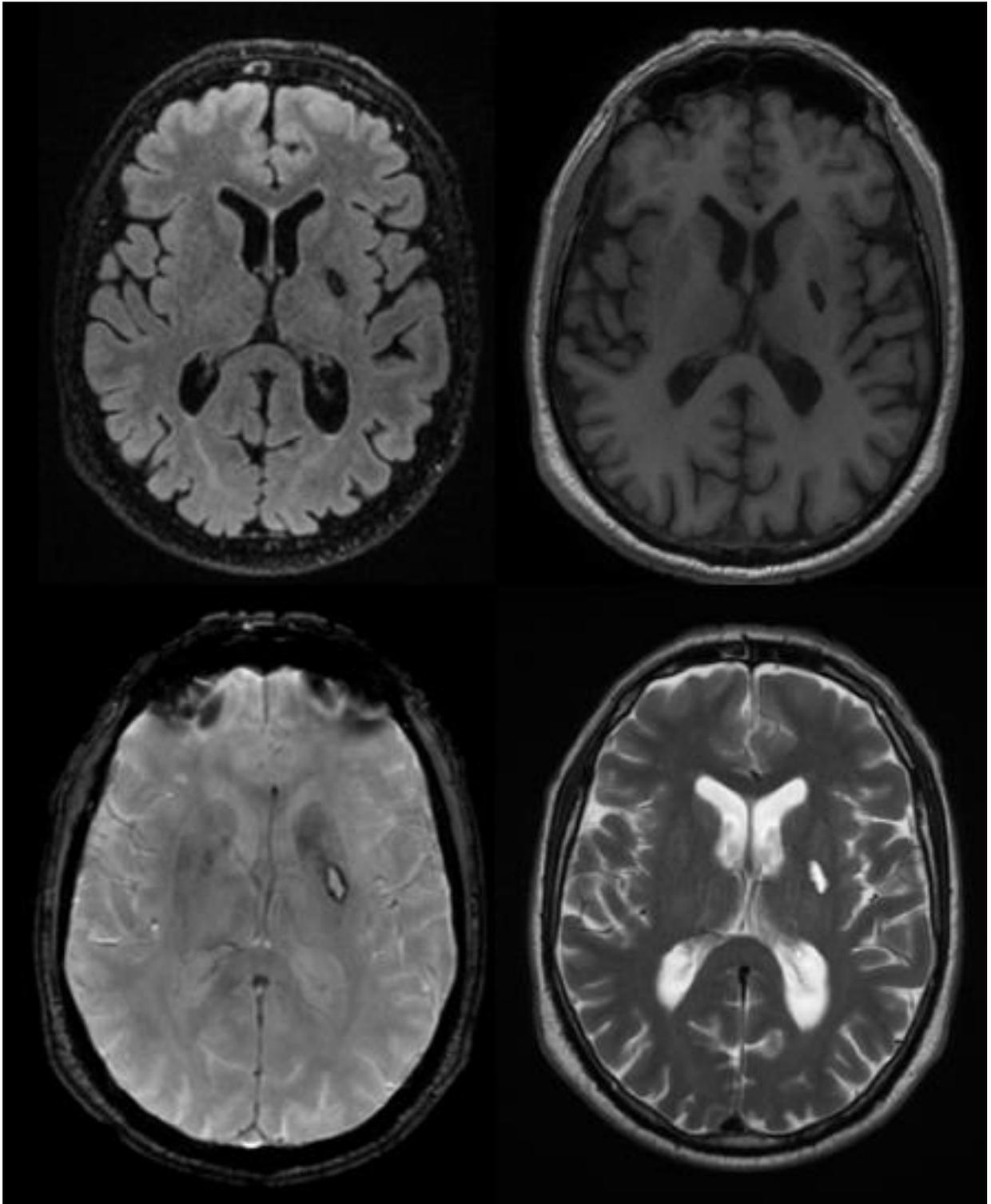


Figura 4 Paziente escluso dallo studio a causa di un evidente esito lacunare di pregresso insulto emorragico nella coda del nucleo lenticolare di sinistra (dall'alto in basso e da sinistra verso destra: MPR Ax 3D FLAIR T2, MPR Ax 3D SPGR, 3D Ax SWAN, Ax TSE T2).

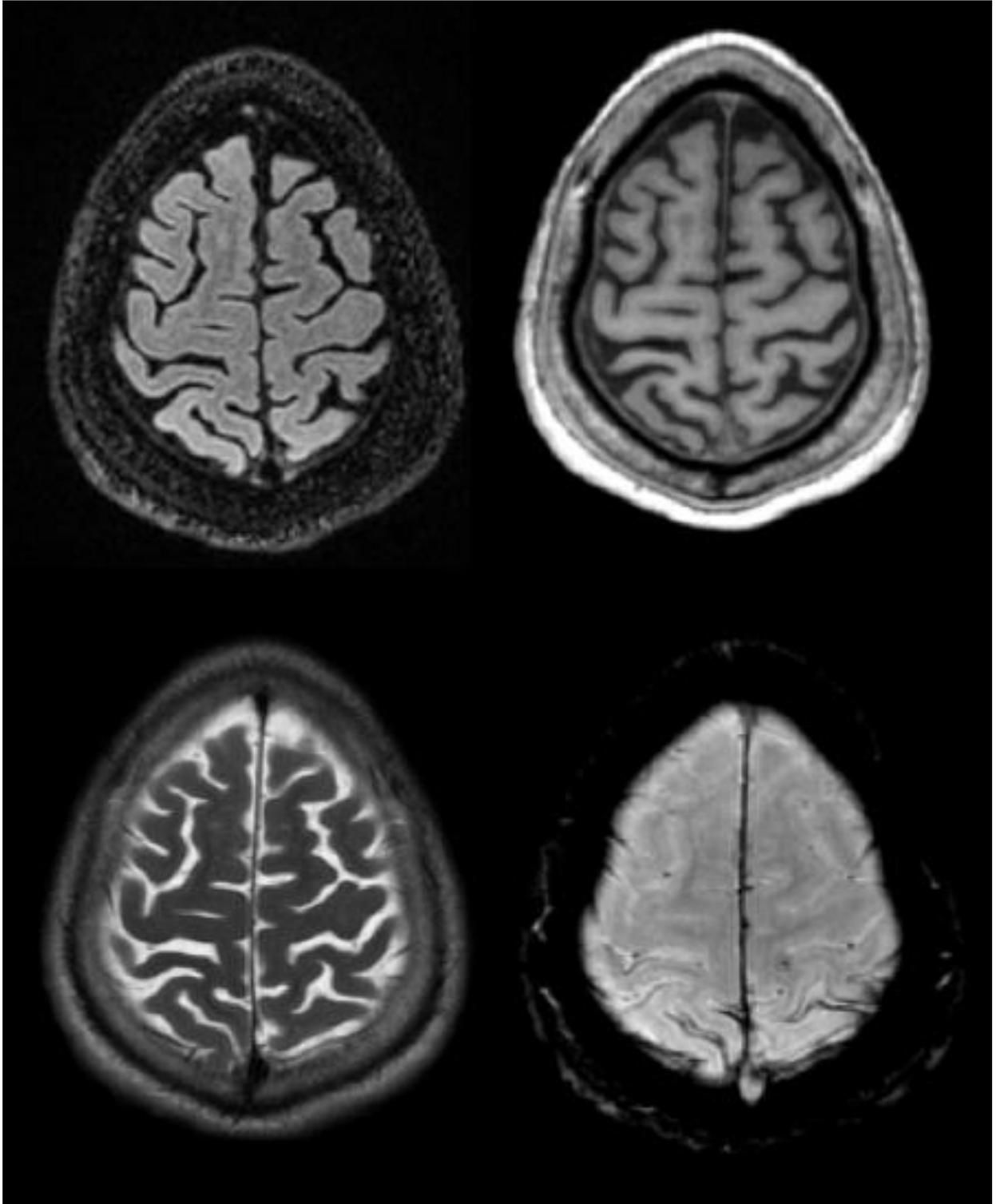


Figura 5 Paziente escluso dallo studio per il riscontro occasionale di segni di emosiderosi superficiale ben apprezzabili in SWAN (in basso a destra) lungo il profilo delle girazioni parietali ed in sede interpeduncolare (non mostrato) da pregressa emorragia subaracnoidea.

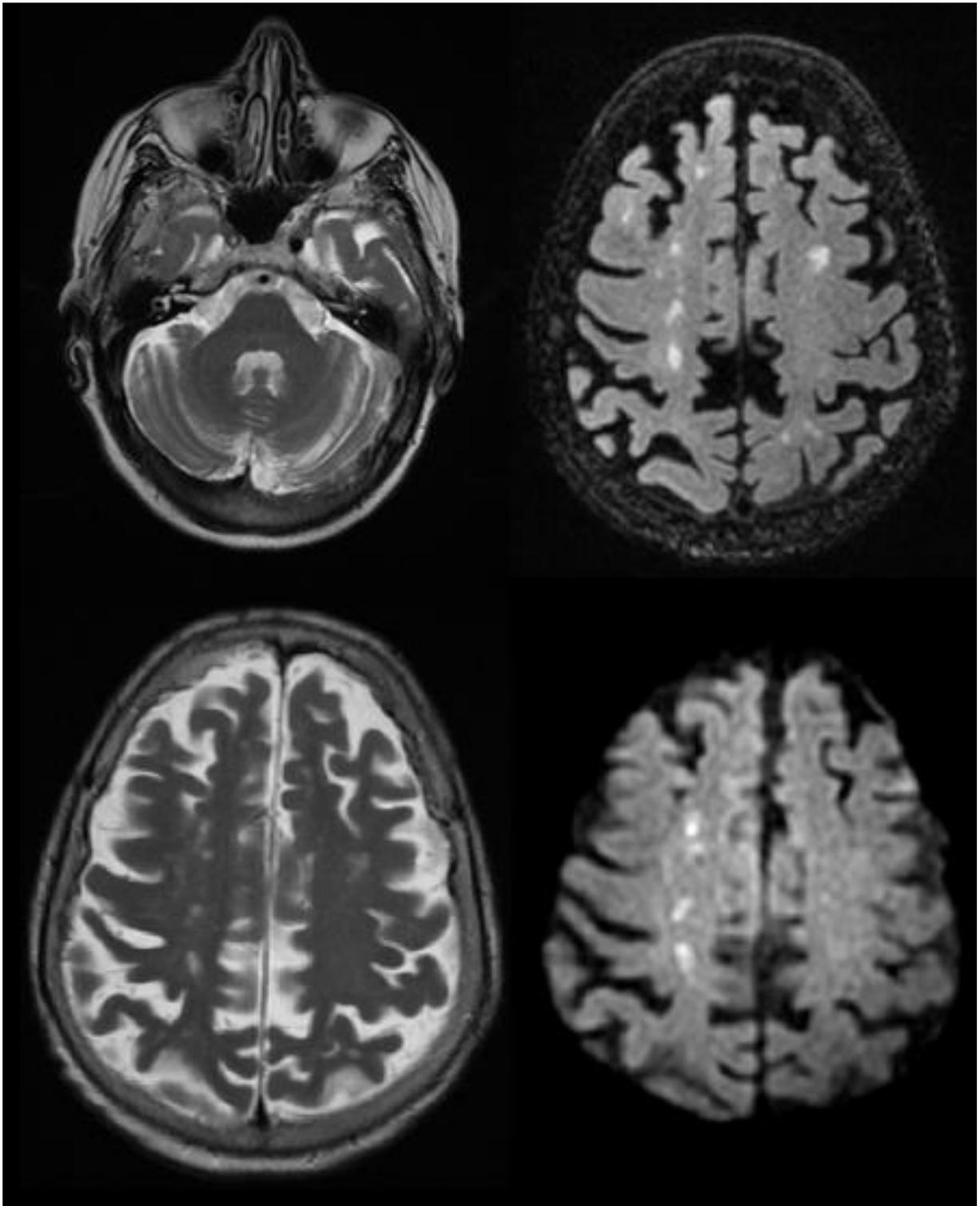


Figura 6 Trombosi del tratto intrapetroso dell'a. carotide interna di destra apprezzabile in TSE T2 (in alto a sinistra) con lesioni ischemiche recenti che mostrano restrizione della diffusività dell'acqua in DWI (in basso a destra) nel territorio di confine tra a. cerebrale media e anteriore omolaterali.

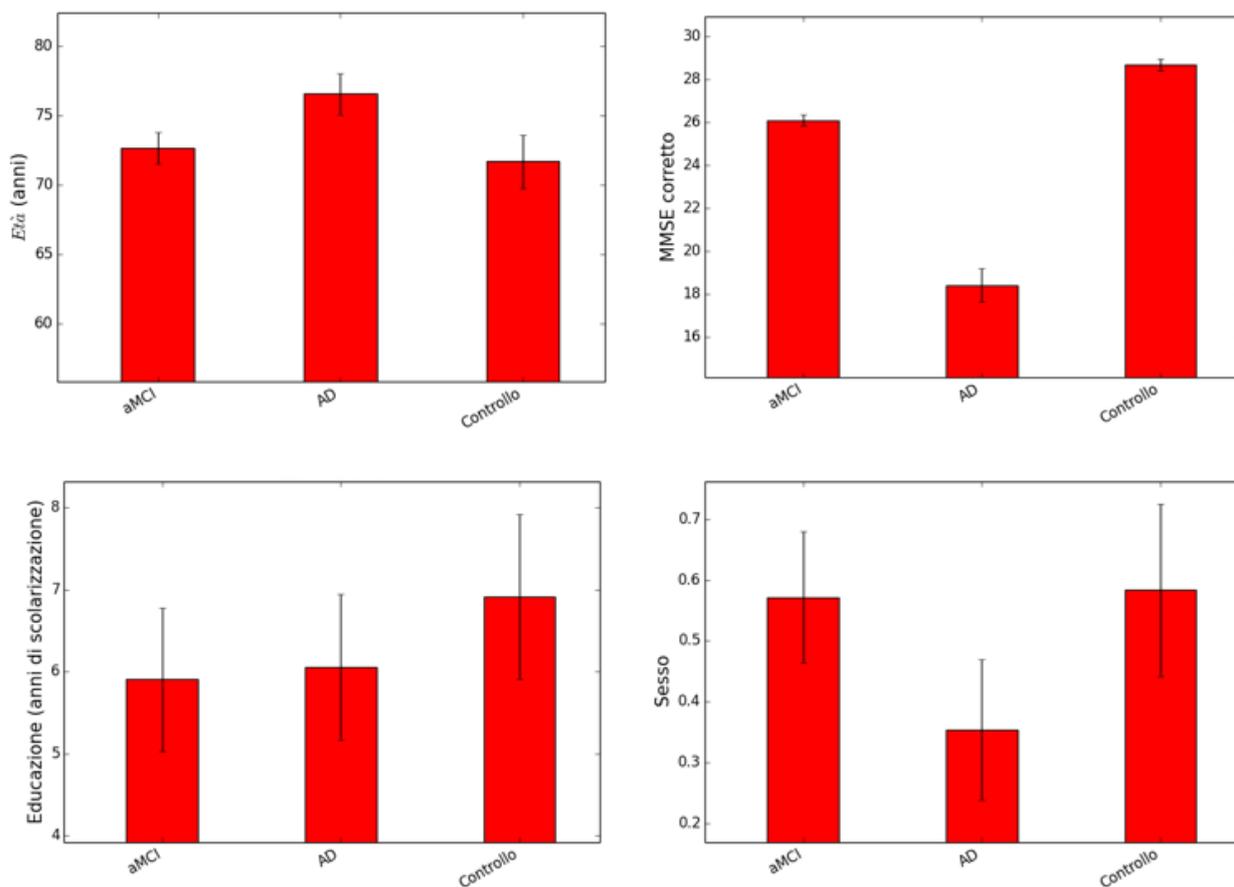


Figura 8 Età, MMSE corretto, scolarizzazione e sesso in termini di medie e deviazioni standard dei tre gruppi di studio.

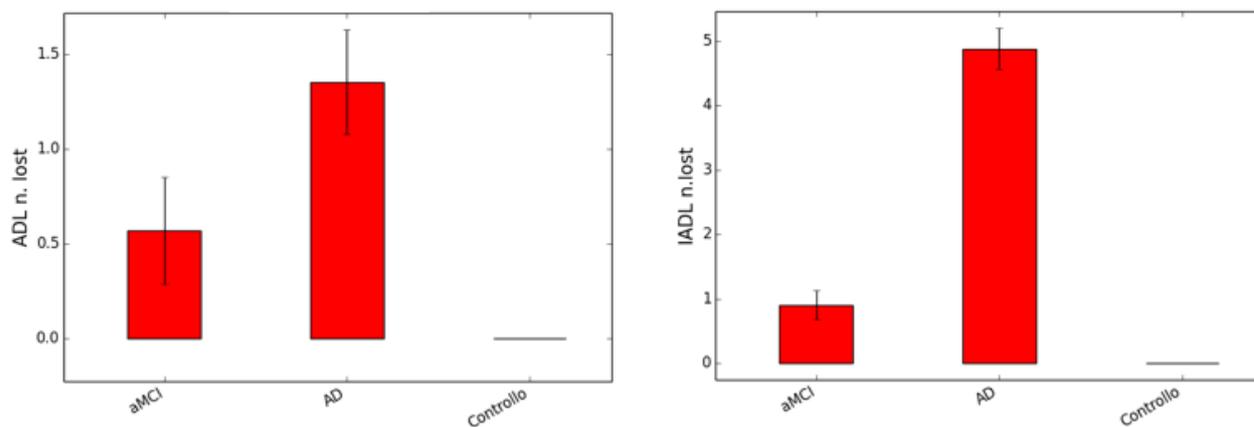


Figura 7 Indici ADL e IADL in termini di medie e deviazioni standard dei tre gruppi di studio.

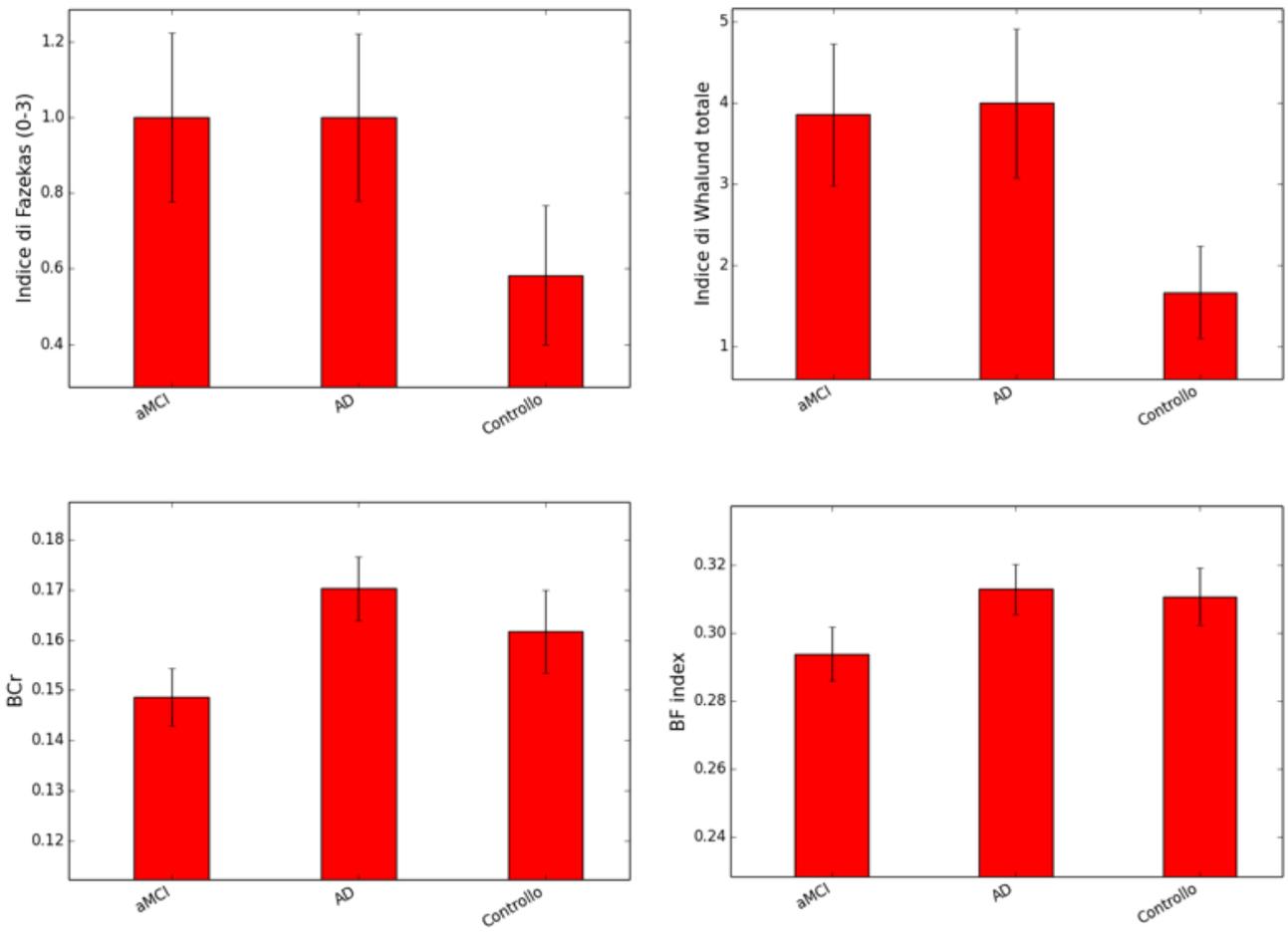


Figura 9 Punteggi scale di Fazekas e Whalund, BCr e BF_i in termini di medie e deviazioni standard dei tre gruppi di studio.

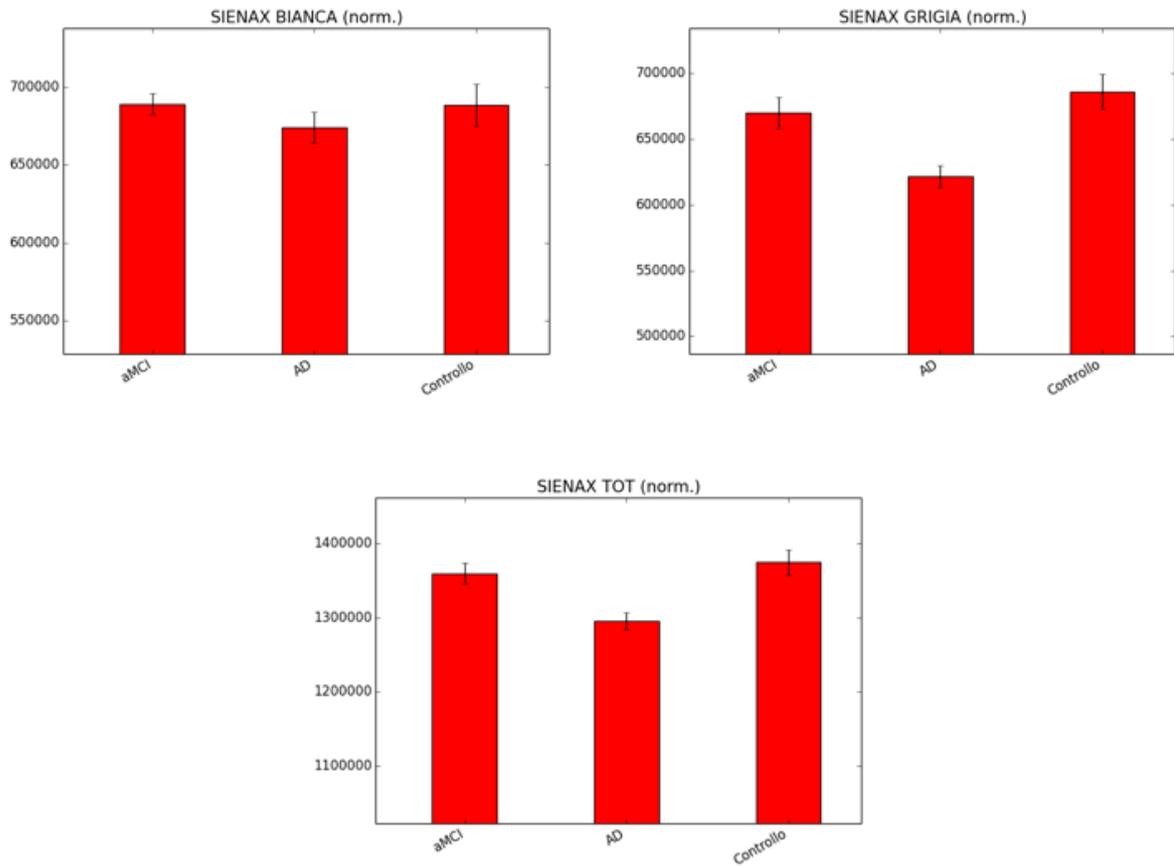


Figura 10 Risultati, in termini di medie e deviazioni standard, dell'analisi di segmentazione morfovolumetrica (dati normalizzati).

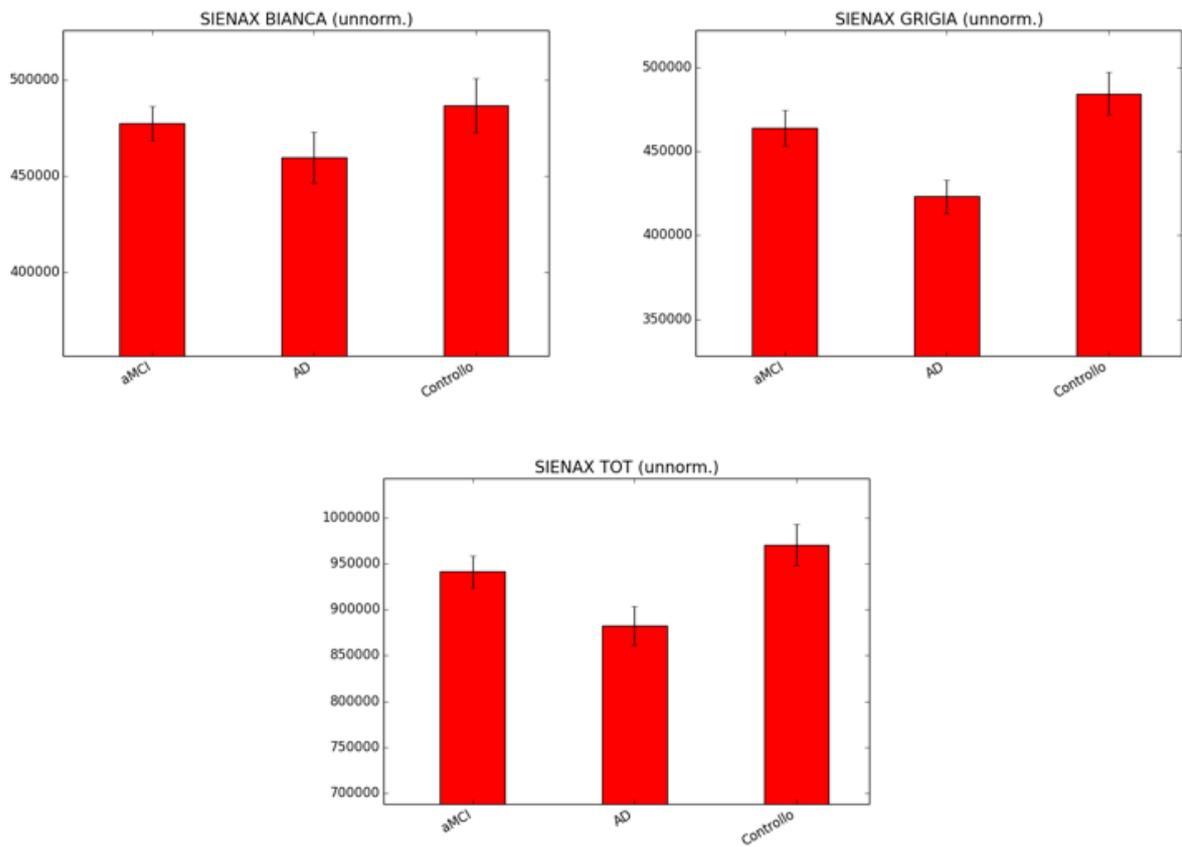


Figura 11 Risultati, in termini di medie e deviazioni standard, dell'analisi di segmentazione morfovolumetrica (dati non normalizzati).

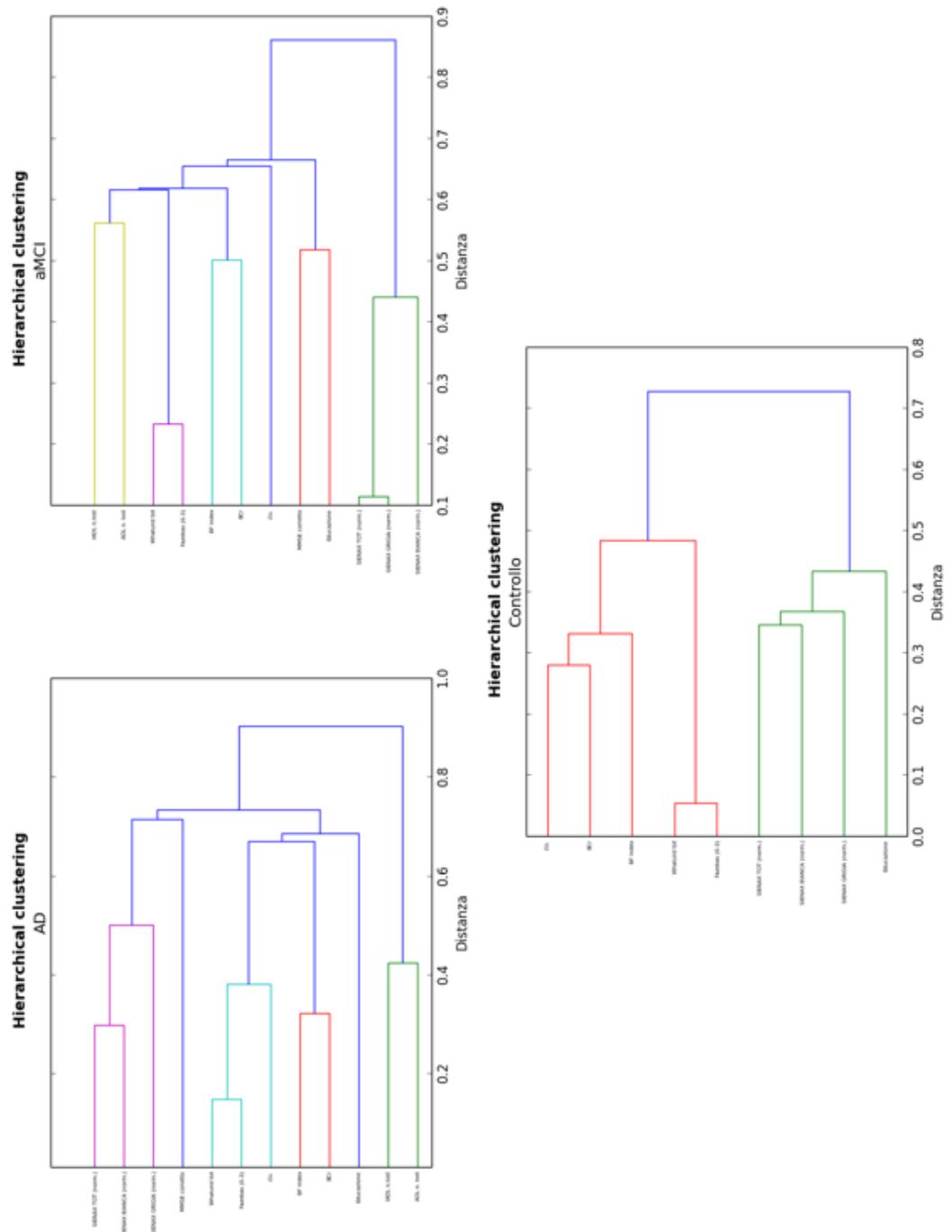


Figura 12 Risultati analisi di clustering gerarchico per i dati di segmentazione normalizzati.

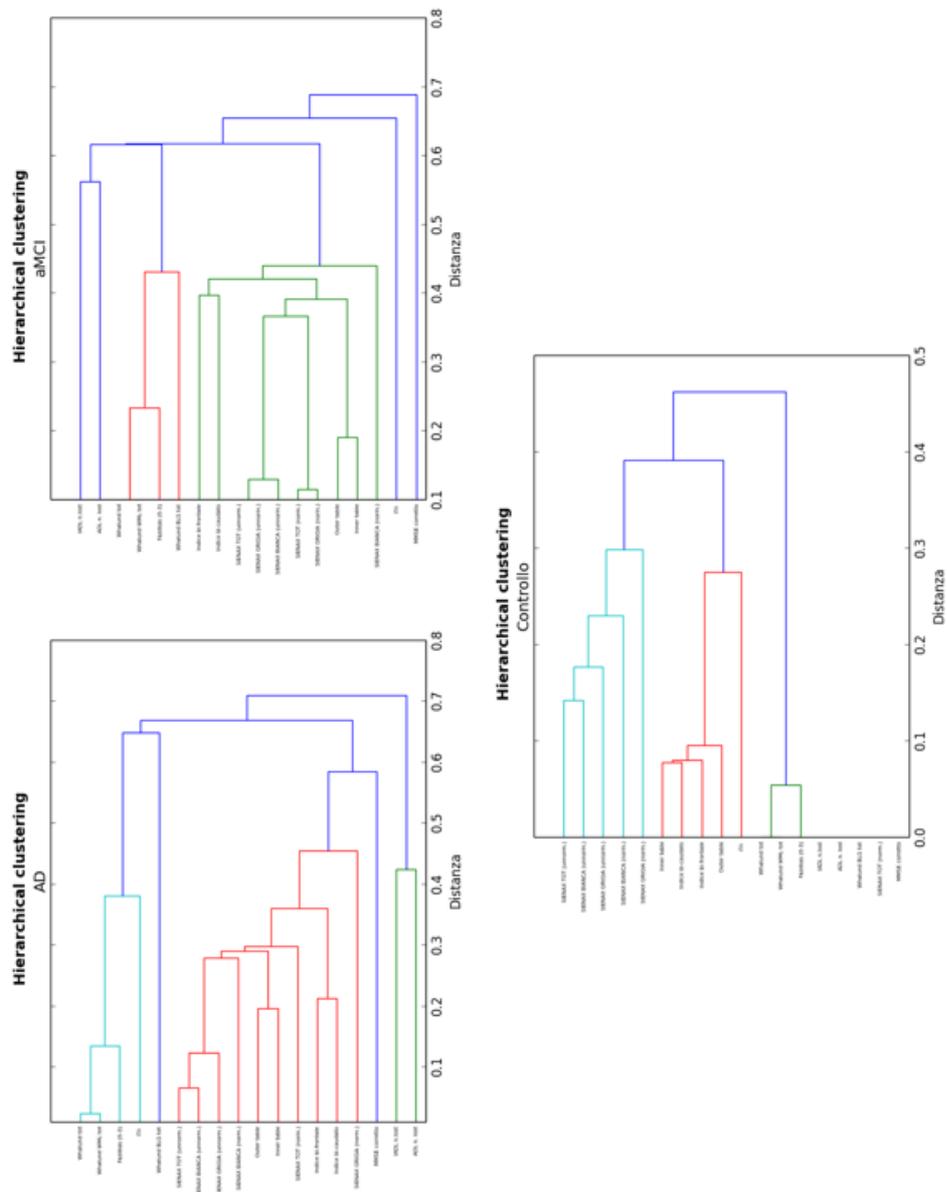


Figura 14 Risultati analisi di clustering gerarchico ottenuti inserendo tutti i parametri raccolti nello studio.

10 Tabelle

Gruppo	N°	Età media	Media scolarizzazione	ADL, n. lost	IADL, n. lost	MMSE corretto
aMCI	21	12♂ 9♀	5,59	0,57	0,90	26,10
AD	17	6♂ 11♀	6,06	1,35	4,88	18,37
PD-MCI	5	1♂ 4♀	5,60	1	3,20	26,70
PD-noMCI	3	1♂ 2♀	11,33	0	1	27,90
Controlli	12	7♂ 5♀	6,92	0	1,42	28,68
Totale o media	58	27♂ 31♀	6,41	0,69	2,09	24,62

Tabella 1 Caratteristiche dei soggetti inclusi nello studio di segmentazione morfovolumetrica.

Test t: st. grigia (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Test t: st. bianca (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Test t: vol. tot. (assumendo varianze diverse tra i campioni)	
AD	Controlli	AD	Controlli	AD	Controlli
Media	621700,7175	684707,8327	67656,8656	688176,8645	1372884,697
Varianza	1320831516	2485427543	1844681054	2635245116	4214150976
Osservazioni	16	11	16	11	16
Differenza ipotizzata per	0	0	0	0	0
gd	17	17	19	17	17
Stat t	-3,587253453		-0,616864688		-3,250202552
PT<=t) una coda	0,001135432		0,272328595		0,002354902
t critico una coda	1,739606726		1,739132812		1,739606726
PT<=t) due code	0,002270865		0,544657189		0,004709803
t critico due code	2,109815578		2,093024054		2,109815578
Test t: st. grigia (assumendo varianze diverse tra i campioni)					
AD	Controlli	AD	Controlli	AD	Controlli
Media	668457,592	684707,8327	687680,235	688176,8645	1372884,697
Varianza	3221429968	2485427543	969953161,9	2635245116	4214150976
Osservazioni	20	11	20	11	20
Differenza ipotizzata per	0	0	0	0	0
gd	23	23	14	21	21
Stat t	-0,826025395		-0,029260855		-0,580026178
PT<=t) una coda	0,20863814		0,488534791		0,251958129
t critico una coda	1,713871528		1,76130136		1,720742903
PT<=t) due code	0,417276281		0,977069582		0,503916259
t critico due code	2,06865761		2,144786688		2,079613845
Test t: st. bianca (assumendo varianze diverse tra i campioni)					
AD	Controlli	AD	Controlli	AD	Controlli
Media	621700,7175	668457,592	67656,8656	688176,8645	1372884,697
Varianza	1320831516	3221429968	1844681054	2635245116	4214150976
Osservazioni	16	20	16	20	16
Differenza ipotizzata per	0	0	0	0	0
gd	33	33	27	34	34
Stat t	-2,995614417		-0,86914527		-3,019405605
PT<=t) una coda	0,002582494		0,196214283		0,002389483
t critico una coda	1,692360309		1,703288446		1,690924255
PT<=t) due code	0,005164987		0,39248566		0,004778965
t critico due code	2,034515297		2,051830516		2,05244509
Test t: vol. tot. (assumendo varianze diverse tra i campioni)					

Tabella 2 Test t tra campioni applicato ai dati di segmentazione normalizzati ($p < 0.05$).

Test t: st. griglia un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	424862,8356	478559,0627	481557,7836
Varianza	1839075724	1912657079	2541968603
Osservazioni	16	11	11
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	21		
Stat t	-3,159584886		
P(T<=t) una coda	0,002362907		
t critico una coda	1,720742903		
P(T<=t) due code	0,004725905		
t critico due code	2,079613865		

Test t: st. bianca un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	463102,5919	481557,7836	
Varianza	3207996755	2541968603	
Osservazioni	16	11	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	23		
Stat t	-0,888349692		
P(T<=t) una coda	0,191774627		
t critico una coda	1,713871528		
P(T<=t) due code	0,383549253		
t critico due code	2,06865761		

Test t: st. griglia un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	463919,2815	478559,0627	
Varianza	2561184419	1912657079	
Osservazioni	20	11	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	23		
Stat t	-0,842512437		
P(T<=t) una coda	0,204088626		
t critico una coda	1,713871528		
P(T<=t) due code	0,408177252		
t critico due code	2,06865761		

Test t: st. griglia un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	424862,8356	463919,2815	
Varianza	1839075724	2561184419	
Osservazioni	16	20	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	34		
Stat t	-2,505464677		
P(T<=t) una coda	0,008590974		
t critico una coda	1,690924255		
P(T<=t) due code	0,017181948		
t critico due code	2,032244509		

Test t: vol. tot. un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	887965,4275	960116,8464	
Varianza	8119804510	5860953697	
Osservazioni	16	11	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	31		
Stat t	-1,831389598		
P(T<=t) una coda	0,038334108		
t critico una coda	1,695518783		
P(T<=t) due code	0,076668215		
t critico due code	2,039513446		

Test t: vol. tot. un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	941413,1923	960116,8464	
Varianza	6884674430	5860953697	
Osservazioni	20	11	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	22		
Stat t	-0,631560342		
P(T<=t) una coda	0,26709109		
t critico una coda	1,71744374		
P(T<=t) due code	0,53418218		
t critico due code	2,073873068		

Test t: vol. tot. un. (assumendo varianze diverse tra i campioni)		Controlli	
AD		AD	
Media	887965,4275	941413,1923	
Varianza	8119804510	6884674430	
Osservazioni	16	20	
Differenza ipotizzata per	0		
gdi	31		
Stat t	-1,831389598		
P(T<=t) una coda	0,038334108		
t critico una coda	1,695518783		
P(T<=t) due code	0,076668215		
t critico due code	2,039513446		

Tabella 3 Test t tra campioni applicato ai dati di segmentazione non normalizzati ($p < 0.05$)

11 Bibliografia

Praragrafi 3 e 4.1

- SiStaN. Annuario Statistico Italiano 2010 - <<http://www.istat.it/it/>>.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV - Washington, DC: American Psychiatric Association, c1994.
- Mariani E, Monastero R, Mecocci P. Mild cognitive impairment: a systematic review. *J Alzheimers Dis.* 2007 Aug;12(1):23-35.
- Aarsland D, Bronnick K, Williams-Gray C, Weintraub D, et Al. Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. *Neurology.* 2010 Sep 21;75(12):1062-9.
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;149:351-356.
- Wahlund LO, Agartz I, Almqvist O, Basun H, Forssell L, Saaf J, Wetterberg L. The brain in healthy aged individuals: MR imaging. *Radiology.* 1990;174:675-679.
- Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, et Al; European Task Force on Age-Related White Matter Changes. Stroke. A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. 2001 Jun;32(6):1318-22.
- Schmidt R, Fazekas F, Offenbacher H, Dusek T, Zach E, Reinhart B, Grieshofer P, Freidl W, Eber B, Schumacher M, et al. Neuropsychologic correlates of MRI white matter hyperintensities: a study of 150 normal volunteers. *Neurology.* 1993 Dec;43(12):2490-4.
- Dai W, Lopez OL, Carmichael OT, Becker JT, Kuller LH, Gach HM. Mild cognitive impairment and alzheimer disease: patterns of altered cerebral blood flow at MR imaging. *Radiology.* 2009 Mar;250(3):856-66. Epub 2009 Jan 21.
- Foy CM, Daly EM, Glover A, O'Gorman R, Simmons A, Murphy DG, Lovestone S. Hippocampal Proton MR Spectroscopy in Early Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Brain Topogr.* 2011 Oct;24(3-4):316-22. Epub 2011 Feb 5.
- Reyngoudt H, Claeys T, Vlerick L, Verleden S, Acou M, Deblaere K, De Deene Y, Audenaert K, Goethals I, Achten E. Age-related differences in metabolites in the posterior cingulate cortex and hippocampus of normal ageing brain: A (1)H-MRS study. *Eur J Radiol.* 2011 Feb 21.
- Wang Y, West JD, Flashman LA, Wishart HA, Santulli RB, Rabin LA, Pare N, Arfanakis K, Saykin AJ. Selective changes in white matter integrity in MCI and older adults with cognitive complaints. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Aug 16.
- O'Dwyer L, Lamberton F, Bokde AL, Ewers M, Faluyi YO, Tanner C, Mazoyer B, O'Neill D, Bartley M, Collins DR, Coughlan T, Prvulovic D, Hampel H. Using Diffusion Tensor Imaging and Mixed-Effects Models to Investigate Primary and Secondary White Matter Degeneration in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis.* 2011 Jun 21.
- O'Dwyer L, Lamberton F, Bokde AL, Ewers M, Faluyi YO, et Al. Multiple indices of diffusion identifies white matter damage in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011;6(6):e21745.
- Kantarci K, Xu Y, Shiung MM, O'Brien PC, Cha RH, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Edland SD, Kokmen E, Tangalos EG, Petersen RC, Jack CR Jr. Comparative diagnostic utility of different MR modalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2002;14(4):198-207.
- Zhang B, Li M, Sun ZZ, Zhu B, Yuan L, Wang Y, Xu Y. Evaluation of functional MRI markers in mild cognitive impairment. *J Clin Neurosci.* 2009 May;16(5):635-41. Epub 2009 Mar 4.
- Wang HL, Yuan HS, Su LM, Zhu Y, Liao J, Zhang MY, Li T, Yu X. Multi-modality magnetic resonance imaging features of cognitive function in mild cognitive impairment. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2010 Aug;49(8):680-3.
- Hauser T, Thomann PA, Stieltjes B, Essig M. Mild cognitive impairment: diagnostic value of different MR techniques. *Radiologe.* 2011 Apr;51(4):285-92.

- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of subjects for the clinician. *J Psychiatry Res* 1975;12:189-198.
- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW (1963) Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA* 185:914–919.
- Lawton MP, Brody EM (1969) Assessment of older people: selfmaintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 9:179–186.

Paragrafo 4.2

- Hauser T, Thomann PA, Stieltjes B, Essig M. Mild cognitive impairment: diagnostic value of different MR techniques. *Radiologe*. 2011 Apr;51(4):285-92.
- S.M. Smith, N. De Stefano, M. Jenkinson, and P.M. Matthews. Normalised accurate measurement of longitudinal brain change. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 25(3):466-475, May/June 2001.
- S.M. Smith, Y. Zhang, M. Jenkinson, J. Chen, P.M. Matthews, A. Federico, and N. De Stefano. Accurate, robust and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *NeuroImage*, 17(1):479-489, 2002.
- S.M. Smith, M. Jenkinson, M.W. Woolrich, C.F. Beckmann, T.E.J. Behrens, H. Johansen-Berg, P.R. Bannister, M. De Luca, I. Drobnjak, D.E. Flitney, R. Niazy, J. Saunders, J. Vickers, Y. Zhang, N. De Stefano, J.M. Brady, and P.M. Matthews. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*, 23(S1):208-219, 2004.
- S.M. Smith. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping*, 17(3):143-155, November 2002.
- M. Jenkinson and S.M. Smith. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis*, 5(2):143-156, June 2001.
- M. Jenkinson, P.R. Bannister, J.M. Brady, and S.M. Smith. Improved optimisation for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *NeuroImage*, 17(2):825-841, 2002.
- Y. Zhang, M. Brady, and S. Smith. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation maximization algorithm. *IEEE Trans. on Medical Imaging*, 20(1):45-57, 2001.
- A.J. Bartsch, N. Bendszus, N. De Stefano, G. Homola, and S. Smith. Extending SIENA for a multi-subject statistical analysis of sample-specific cerebral edge shifts: Substantiation of early brain regeneration through abstinence from alcoholism. In *Tenth Int. Conf. on Functional Mapping of the Human Brain*, 2004.

Paragrafo 4.3

- S Colagrande, S Pallotta, A Vanzulli, M Napolitano, and N Villari. The diffusion parameter in magnetic resonance: physics, techniques, and semeiotics. *La Radiologia Medica*, 109(1-2):1–16, 2004.
- S Colagrande, SF Carbone, LM Carusi, M Cova, and N Villari. Magnetic resonance diffusion-weighted imaging: extraneurological applications. *La radiologia medica*, 111(3):392–419, 2006.
- Salvatore Cappabianca, Francesco Iaselli, Alfonso Reginelli, Alfredo DAndrea, Fabrizio Urraro, Roberto Grassi, and Antonio Rotondo. Value of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the characterization of complex adnexal masses. *Tumori*, 99(2):210–217, 2013.
- Alfredo Conti, Antonio Pontoriero, Giuseppe Ricciardi, Francesca Granata, Sergio Vinci, Filippo Angileri, Stefano Pergolizzi, Concetta Alafaci, Vincenzo Rizzo, Angelo Quartarone, et al. Integration of functional neuroimaging in cyberknife radiosurgery: feasibility and dosimetric results. *Neurosurgical focus*, 34(4):E5, 2013.
- GDeNunzio, GPastore, MDonativi, ACastellano, and AFalini. ACAD system for cerebral glioma based on texture features in DT-MR images. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 648:S100–S102, 2011.
- Farida Grinberg, Ezequiel Farrher, Luisa Ciobanu, Françoise Geffroy, Denis Le Bihan, and N Jon Shah. Non-Gaussian Diffusion Imaging for Enhanced Contrast of Brain Tissue Affected by Ischemic Stroke. *PloS one*, 9(2):e89225, 2014.
- Silvia De Santis, Andrea Gabrielli, Marco Palombo, Bruno Maraviglia, and Silvia Capuani. Non-Gaussian diffusion imaging: a brief practical review. *Magnetic resonance imaging*, 29(10):1410–1416, 2011.

- Yaniv Assaf and Yoram Cohen. Non-Mono-Exponential Attenuation of Water and N-Acetyl Aspartate Signals Due to Diffusion in Brain Tissue. *Journal of Magnetic Resonance*, 131(1):69–85, 1998.9. Peter J Basser and Derek K Jones. Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis—a technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8):456–467, 2002.
- Mariana Lazar, Jens H Jensen, Liang Xuan, and Joseph A Helpert. Estimation of the orientation distribution function from diffusional kurtosis imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 60(4):774–781, 2008.
- David S Tuch, Timothy G Reese, Mette R Wiegell, Nikos Makris, John W Belliveau, and Van J Wedeen. High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity. *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(4):577–582, 2002.
- Jens H Jensen, Joseph A Helpert, Anita Ramani, Hanzhang Lu, and Kyle Kaczynski. Diffusional kurtosis imaging: The quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(6):1432–1440, 2005.
- Edward S Hui, Matthew M Cheung, Liqun Qi, and Ed X Wu. Towards better MR characterization of neural tissues using directional diffusion kurtosis analysis. *Neuroimage*, 42(1):122–134, 2008.
- Ed X Wu and Matthew M Cheung. MR diffusion kurtosis imaging for neural tissue characterization. *NMR in Biomedicine*, 23(7):836–848, 2010.
- Joseph A Helpert, Vitria Adisetiyo, Maria F Falangola, Caixia Hu, Adriana Di Martino, Kathleen Williams, Francisco X Castellanos, and Jens H Jensen. Preliminary evidence of altered gray and white matter microstructural development in the frontal lobe of adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder: A diffusional kurtosis imaging study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 33(1):17–23, 2011.
- Jens H Jensen, Joseph A Helpert, Anita Ramani, Hanzhang Lu, and Kyle Kaczynski. Diffusional kurtosis imaging: The quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(6):1432–1440, 2005.
- Edward S Hui, Matthew M Cheung, Liqun Qi, and Ed X Wu. Towards better MR characterization of neural tissues using directional diffusion kurtosis analysis. *Neuroimage*, 42(1):122–134, 2008.
- Ed X Wu and Matthew M Cheung. MR diffusion kurtosis imaging for neural tissue characterization. *NMR in Biomedicine*, 23(7):836–848, 2010.
- Joseph A Helpert, Vitria Adisetiyo, Maria F Falangola, Caixia Hu, Adriana Di Martino, Kathleen Williams, Francisco X Castellanos, and Jens H Jensen. Preliminary evidence of altered gray and white matter microstructural development in the frontal lobe of adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder: A diffusional kurtosis imaging study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 33(1):17–23, 2011.
- Jens H Jensen and Joseph A Helpert. MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. *NMR in Biomedicine*, 23(7):698–710, 2010.
- Hanzhang Lu, Jens H Jensen, Anita Ramani, and Joseph A Helpert. Three-dimensional characterization of non-gaussian water diffusion in humans using diffusion kurtosis imaging. *NMR in Biomedicine*, 19(2):236–247, 2006.
- Ali Tabesh, Jens H Jensen, Babak A Ardekani, and Joseph A Helpert. Estimation of tensors and tensor-derived measures in diffusional kurtosis imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 65(3):823–836, 2011.
- Jelle Veraart, Wim Van Hecke, and Jan Sijbers. Constrained maximum likelihood estimation of the diffusion kurtosis tensor using a Rician noise model. *Magnetic Resonance in Medicine*, 66(3):678–686, 2011.
- Tristan A Kuder, Bram Stieltjes, Peter Bachert, Wolfhard Semmler, and Frederik B Laun. Advanced fit of the diffusion kurtosis tensor by directional weighting and regularization. *Magnetic Resonance in Medicine*, 67(5):1401–1411, 2012.
- TG Reese, O Heid, RM Weisskoff, and VJ Wedeen. Reduction of eddy-current-induced distortion in diffusion MRI using a twice-refocused spin echo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49(1):177–182, 2003.
- CPierpaoli, LWalker, MOIrfanoglu, ABarnett, PBasser, LCChang, CKoay, SPajevic, GRohde, J Sarlls, and M Wu. TORTOISE: an integrated software package for processing of diffusion MRI data. Proceedings 18th Scientific Meeting, International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2010.

- G Collura, M Marrale, N Toschi, C Gagliardo, M Midiri, and M Brai. Sviluppo di un software per l'analisi di immagini di Diffusion Kurtosis Imaging. Proceedings AIRP - Atti del XXXVI Convegno Nazionale di Radioprotezione, Palermo, 18 - 20 settembre 2013, 2013.
- Jimmy La 'tt, Markus Nilsson, Ronnie Wirestam, Freddy Ståhlberg, Nils Karlsson, Mikael Johansson, Pia C Sundgren, and Danielle van Westen. Regional values of diffusional kurtosis estimates in the healthy brain. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 37(3):610–618, 2013.
- Christian Beaulieu. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system – a technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8):435–455, 2002.
- Peter J Basser and Carlo Pierpaoli. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, 111(3):209–219, 1996.
- Andrea Chincarini, Paolo Bosco, Gianluca Gemme, Silvia Morbelli, Dario Arnaldi, Francesco Sensi, Ilaria Solano, Nicola Amoroso, Sabina Tangaro, Renata Longo, et al. Alzheimers disease markers from structural MRI and FDG-PET brain images. *The European Physical Journal Plus*, 127(11):1–16, 2012.
- Flavio Nobili, Dario Arnaldi, Luca Roccatagliata, Andrea Chincarini, Jennifer Accardo, Agnese Picco, Michela Ferrara, Ambra Buschiazzo, and Silvia Morbelli. Neuroimaging Findings in Mild Cognitive Impairment. *PET and SPECT in Neurology*, pages 271–307, 2014.
- Dmitriy A Yablonskiy, G Larry Bretthorst, and Joseph JH Ackerman. Statistical model for diffusion attenuated MR signal. *Magnetic resonance in medicine*, 50(4):664–669, 2003.
- RJ Sevick, J Kucharczyk, J Mintorovitch, ME Moseley, N Derugin, and D Norman. Diffusion-weighted MR imaging and T2-weighted MR imaging in acute cerebral ischaemia: comparison and correlation with histopathology. In *Brain Edema VIII*, pages 210–212. Springer, 1990.
- C Hu, JH Jensen, MF Falangola, and JA Helpert. CSF partial volume effect for diffusion kurtosis imaging. Proceedings 16th Scientific Meeting, International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2008.
- Maria F Falangola, Jens H Jensen, Ali Tabesh, Caixia Hu, Rachael L Deardorff, James S Babb, Steven Ferris, and Joseph A Helpert. Non-Gaussian diffusion MRI assessment of brain microstructure in mild cognitive impairment and Alzheimers disease. *Magnetic resonance imaging*, 31(6):840–846, 2013.
- Koji Kamagata, Hiroyuki Tomiyama, Yumiko Motoi, Masayoshi Kano, Osamu Abe, Kenji Ito, Keigo Shimoji, Michimasa Suzuki, Masaaki Hori, Atsushi Nakanishi, et al. Diffusional kurtosis imaging of cingulate fibers in Parkinson disease: Comparison with conventional diffusion tensor imaging. *Magnetic resonance imaging*, 31(9):1501–1506, 2013.
- Jiun-Jie Wang, Wey-Yil Lin, Chin-Song Lu, Yi-Hsin Weng, Shu-Hang Ng, Chi-Hong Wang, Hao-Li Liu, Ren-Hsiang Hsieh, Yung-Liang Wan, and Yau-Yau Wai. Parkinson disease: diagnostic utility of diffusion kurtosis imaging. *Radiology*, 261(1):210–217, 2011.
- Sofie Van Cauter, Jelle Veraart, Jan Sijbers, Ronald R Peeters, Uwe Himmelreich, Frederik De Keyser, Stefaan W Van Gool, Frank Van Calenbergh, Steven De Vleeschouwer, Wim Van Hecke, et al. Gliomas: diffusion kurtosis MR imaging in grading. *Radiology*, 263(2):492–501, 2012.
- Keigo Shimoji, Takanori Uka, Yoshifumi Tamura, Mariko Yoshida, Koji Kamagata, Masaaki Hori, Yumiko Motoi, Hirotaka Watada, Ryuzo Kawamori, and Shigeki Aoki. Diffusional kurtosis imaging analysis in patients with hypertension. *Japanese journal of radiology*, 32(2):98–104, 2014.
- Yuzhen Zhang, Xu Yan, Yu Gao, Dongrong Xu, Jie Wu, and Yuhua Li. A preliminary study of epilepsy in children using diffusional kurtosis imaging. *Clinical neuroradiology*, 23(4):293–300, 2013.
- M Solarino, A Iovane, and R Sutera. Principi di diagnostica per immagini in medicina dello sport, chapter 18, pages 163–180. EdiSES, 1 edition, 2014. Trauma cranico nello sport. by Gagliardo, C and La Tona, G and Iovane, A.
- EJ Grossman, JH Jensen, JS Babb, Q Chen, A Tabesh, E Fieremans, D Xia, M Inglese, and RIG Grossman. Cognitive impairment in mild traumatic brain injury: a longitudinal diffusional kurtosis and perfusion imaging study. *American Journal of Neuroradiology*, 34(5):951–957, 2013.
- Jiachen Zhuo, Su Xu, Julie L Proctor, Roger J Mullins, Jonathan Z Simon, Gary Fiskum, and Rao P Gullapalli. Diffusion kurtosis as an in vivo imaging marker for reactive astrogliosis in traumatic brain injury. *Neuroimage*, 59(1):467–477, 2012.

Paragrafo 4.4

- S.M. Smith, M. Jenkinson, H. Johansen-Berg, D. Rueckert, T.E. Nichols, C.E. Mackay, K.E. Watkins, O. Ciccarelli, M.Z. Cader, P.M. Matthews, and T.E.J. Behrens. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage*, 31:1487-1505, 2006.
- S.M. Smith, M. Jenkinson, M.W. Woolrich, C.F. Beckmann, T.E.J. Behrens, H. Johansen-Berg, P.R. Bannister, M. De Luca, I. Drobnjak, D.E. Flitney, R. Niazy, J. Saunders, J. Vickers, Y. Zhang, N. De Stefano, J.M. Brady, and P.M. Matthews. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*, 23(S1):208-219, 2004.
- S.M. Smith. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping*, 17(3):143-155, November 2002.
- J.L.R. Andersson, M. Jenkinson and S. Smith. Non-linear optimisation. FMRIB technical report TR07JA1 from www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep
- J.L.R. Andersson, M. Jenkinson and S. Smith. Non-linear registration, aka Spatial normalisation FMRIB technical report TR07JA2 from www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep
- D. Rueckert, L. I. Sonoda, C. Hayes, D. L. G. Hill, M. O. Leach, and D. J. Hawkes. Non-rigid registration using free-form deformations: Application to breast MR images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 18(8):712-721, 1999.