



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

***Ruolo della Risonanza Magnetica Funzionale nella
diagnosi precoce di Malattia di Alzheimer: valutazione
dell'attività cerebrale nello stato di riposo***

CANDIDATO

Umberto Tani

RELATORE

Chia.mo Dott. Mirco Cosottini

Anno accademico 2006-2007

INDICE

Ruolo della Risonanza Magnetica Funzionale nella diagnosi precoce di Malattia di Alzheimer: valutazione dell'attività cerebrale nello stato di riposo

INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1 Risonanza magnetica funzionale	5
1.1 Effetto BOLD	6
1.2 Accoppiamento tra attività nervosa e iperemia funzionale	6
1.3 Risposta emodinamica	8
1.4 Sequenze ecoplanari per RMf	10
1.5 Preprocessing dei dati funzionali	12
1.6 Paradigmi sperimentali	13
CAPITOLO 2 Analisi statistica dei dati	14
2.1 Modello Generale Lineare	14
2.2 Analisi delle componenti indipendenti	15
CAPITOLO 3 L'attività cerebrale nello stato di riposo	16
3.1 Definizione	16
3.2 Paradigmi sperimentali di studio	18
CAPITOLO 4 Malattia di Alzheimer	20
CAPITOLO 5 Mild Cognitive Impairment (MCI)	27
CAPITOLO 6 Diagnosi precoce di malattia di Alzheimer: un metodo per la valutazione dell'attività cerebrale a riposo basato sull'ICA.	29
6.1 Obiettivi	30
6.2 Materiali e Metodi	30
6.3 Risultati	36
6.4 Discussione	37
BIBLIOGRAFIA	42

INTRODUZIONE

Il Morbo di Alzheimer (MA) rappresenta la forma di demenza idiopatica di più frequente riscontro nella popolazione generale dopo la quinta decade rappresentando circa il 60% di tutti i casi di demenza. Come per altre patologie neurodegenerative idiopatiche la diagnosi di certezza è possibile solo attraverso l'esame istologico post-mortem, mentre nella pratica clinica la diagnosi è caratterizzata da livelli più o meno elevati di probabilità ed è supportata da scale per la valutazione della demenza e da test neuropsicologici che consentono una valutazione mirata delle singole sfere cognitive.

In questo scenario l'imaging strumentale, TC e RM, ha semplicemente il ruolo di escludere cause di demenza secondaria. Nonostante il supporto dei test cognitivi la diagnosi di MA, rimane spesso incerta, soprattutto nelle fasi iniziali. D'altra parte una diagnosi precoce consente una maggiore efficacia sia delle terapie farmacologiche che psico-comportamentali. Questo ha incoraggiato la ricerca di nuovi *marker* di malattia.

Nel campo delle neuroimmagini sono state sviluppate tecniche morfometriche per la valutazione precoce dell'atrofia cerebrale da un lato, e tecniche di RM funzionale per individuare alterazioni iniziali di specifici circuiti neuronali dall'altro.

La maggior parte degli studi funzionali ha indagato alterazioni delle reti di memoria (Working-Memory Network) ma recentemente alcuni autori hanno focalizzato l'attenzione sulla cosiddetta Default-Mode-Network (DMN), una rete neuronale che si attiva in maniera specifica durante lo stato di riposo ed è modulata negativamente durante l'esecuzione di compiti cognitivi.

In questo lavoro di tesi viene illustrato un metodo automatico, basato su modelli statistici non-inferenziali, per quantificare la connettività funzionale della DMN. Questo metodo è stato utilizzato per indagare l'attività cerebrale in

condizioni di riposo in 12 pazienti con Malattia di Alzheimer in stadio precoce, 12 pazienti con Mild-Cognitive-Impairment e 17 controlli anziani.

Sulla base dei nostri risultati la connettività funzionale della DMN sembra essere significativamente ridotta in pazienti affetti da malattia di Alzheimer; inoltre sembra essere presente un valore soglia che discrimina i pazienti con malattia di Alzheimer CDR 1 (Clinical Dementia Rate scale) sia dai controlli anziani che dai soggetti affetti da Mild-Cognitive-Impairment.

In conclusione la metodica proposta sembra essere interessante per la valutazione di pazienti che lamentano disturbi di memoria. Tuttavia sono necessari studi longitudinali per verificarne l'accuratezza rispetto ai tradizionali criteri clinici e per confermare la sua utilità nel processo diagnostico di malattia di Alzheimer.

CAPITOLO 1

Risonanza magnetica funzionale

La risonanza magnetica funzionale (RMf) è una metodica di recente introduzione nel campo dell'imaging. La sua comparsa risale ai primi anni novanta quando K.Thulborn e S.Ogawa, sfruttando l'effetto BOLD descritto molti anni prima da L.Pauling, ottennero immagini MR contenenti informazioni sull'attività cerebrale regionale.

La risonanza magnetica funzionale si affianca ad altre metodiche funzionali, ovvero alla magneto/elettro-fisiologia (EEG e MEG) ed alla medicina nucleare (PET e SPECT) (Fig.1). Il principale vantaggio della RMf rispetto alle altre metodiche è rappresentato dall'elevata risoluzione spaziale, che nella tecnologia a campi ultra-elevati (3-7 tesla) può raggiungere dimensioni sub-millimetriche.

Sebbene la RMf non possa competere con le tecniche magneto-elettrofisiologiche in termini di risoluzione temporale, da questo punto di vista essa supera di gran lunga la medicina nucleare. Inoltre rispetto alla PET, la RMf consente nella medesima sessione d'esame di acquisire immagini sia anatomiche che funzionali e non fa uso di radiazioni ionizzanti.

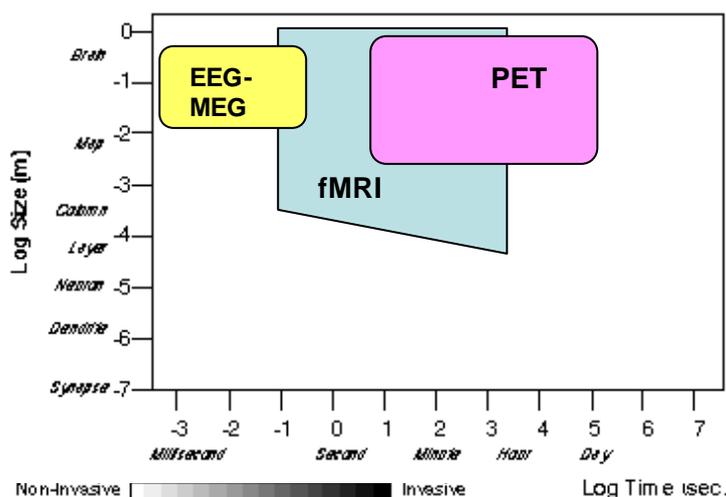


Fig. 1: risoluzione spaziale e temporale delle metodiche di imaging funzionale rispetto all'EEG-MEG.

1.1 Effetto BOLD

L'effetto BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent effect) è legato alla variazione delle proprietà magnetiche del sangue in relazione al suo stato di ossigenazione.

L'emoglobina, diamagnetica nel suo stato ossigenato (ossi-Hb), assume proprietà paramagnetiche in seguito alla perdita del legame con l'ossigeno (deossi-Hb).

Una sostanza si definisce diamagnetica se immersa in un campo magnetico (B_0) non deforma significativamente le linee del campo. Al contrario, una sostanza si definisce paramagnetica se, all'interno di un campo magnetico, si comporta da dipolo, ovvero si orienta lungo la direzione del campo determinandone una variazione locale dell'intensità. La deformazione locale delle linee di campo si traduce in una perdita di segnale nelle immagini RM (susceptività magnetica).

L'effetto di susceptività magnetica della desossi-Hb è accentuato quando l'emoglobina è compartimentalizzata, come normalmente accade negli eritrociti e nelle sedi intravascolari. La presenza di deossi-Hb intravascolare produce microscopiche disomogeneità di campo che aumentano lo sfasamento degli atomi di idrogeno più vicini e determinano una riduzione del segnale proveniente dal tessuto nervoso irrorato. La riduzione della concentrazione di desossi-Hb si traduce in un aumento relativo del segnale.

1.2 Accoppiamento tra attività nervosa e iperemia funzionale

L'applicazione dell'effetto BOLD all'indagine della funzione cerebrale fa seguito all'osservazione che l'attivazione neuronale in una specifica regione

dell'encefalo si associa ad una variazione locale dello stato di ossigenazione del sangue.

Le prime ricerche sull'esistenza di un legame fisiologico tra attività nervosa e apporto di sangue risalgono alla fine del 1800. E' stato successivamente dimostrato che l'attivazione di una specifica area cerebrale determina l'aumento locale sia del flusso (CBF, *cerebral blood flow*) che del volume ematico (CBV, *cerebral blood volume*); tale variazione nell'apporto di sangue è chiamata iperemia funzionale.

L'incremento del flusso ematico locale risponde all'aumentato fabbisogno energetico legato all'attivazione neuronale, in particolare all'attività della pompa Na⁺/K⁺ ATPasi a livello post-sinaptico.

L'ipotesi oggi più accreditata per spiegare il fenomeno dell'iperemia funzionale attribuisce un ruolo centrale alla produzione locale di adenosina e al rilascio di ioni potassio (K⁺). Secondo tale ipotesi questi metaboliti determinerebbero vasodilatazione e incremento del CBF delle arteriole intracorticali che irrorano la colonna neuronale attivata. Inoltre lo stesso glutammato rilasciato a livello sinaptico avrebbe un effetto vasodilatatorio diretto sulla parete vascolare.

Mentre adenosina, ioni K⁺ e glutammato agiscono su vasi localizzati in stretta vicinanza alla sede di attivazione neuronale, mantenendo un'alta specificità spaziale della risposta vascolare, un secondo meccanismo di vasodilatazione, mediato dal nitrossido di azoto (NO₂) agisce su più ampia scala determinando vasodilatazione in corrispondenza di territori nervosi circostanti non attivati (Fig. 2). Questo limita in maniera importante la specificità dell'iperemia funzionale e quindi la risoluzione spaziale della metodica che, a intensità di campo magnetico convenzionale (1,5 T) si aggira attorno ai 3-4mm². Tuttavia ad intensità di campo ultra-elevate (3-7 T) è stato possibile raggiungere risoluzioni spaziali prossime al millimetro o addirittura sub millimetriche, sfruttando l'esistenza di un gradiente nell'entità dell'iperemia funzionale dal centro alla periferia della zona attivata.

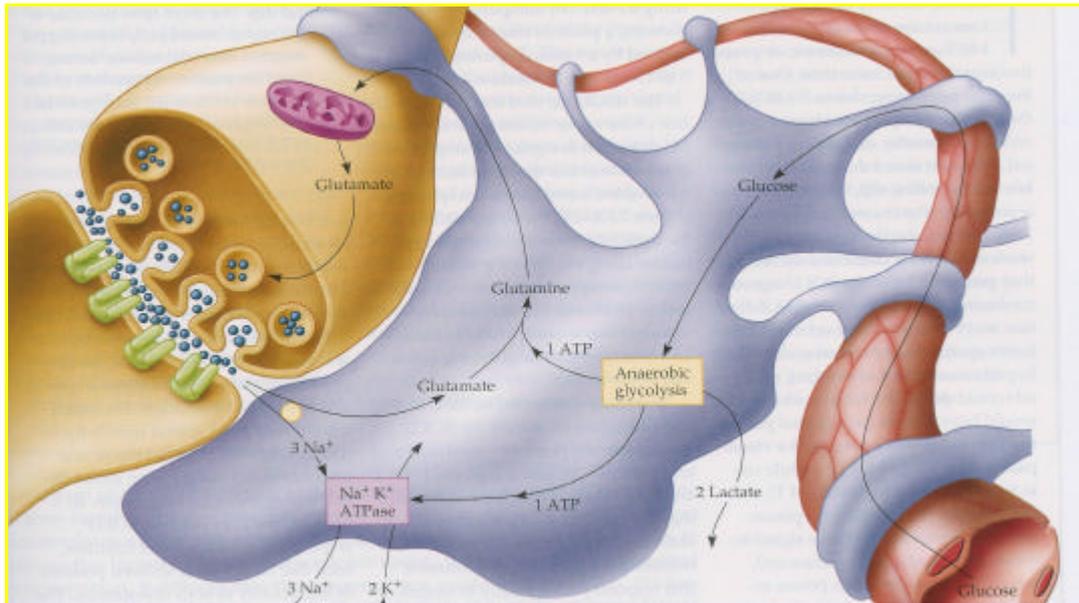


Fig. 2: Sinapsi tripartita.

1.3 Risposta emodinamica

L'attività neuronale determina inizialmente la riduzione della concentrazione locale di ossigeno a causa dell'aumentato fabbisogno energetico (*risposta precoce*).

In seguito, l'iperemia funzionale reattiva determina un aumento dell'apporto di O_2 che supera l'estrazione da parte del tessuto nervoso e quindi una riduzione della concentrazione di desossi-Hb (*risposta principale*) (Fig.3-4).

La riduzione di desossi-Hb si traduce in un minor effetto di suscettività magnetica sull'ambiente protonico circostante e in un aumento locale del segnale la cui entità dipende dall'intensità del campo B_0 in maniera esponenziale (circa l'1-5% del segnale globale a 1,5T, circa 15% a 4T).

La variazione del rapporto tra ossi-Hb e desossi-Hb avviene con un ritardo di circa 2 secondi rispetto all'attivazione neuronale, si mantiene per circa 10 secondi dal termine dell'attivazione stessa (Fig.5).

Questa dinamica temporale è legata alla realizzazione delle cascate metaboliche che sottendono i processi di controllo del tono vascolare e rappresentano un limite intrinseco della risoluzione temporale in RMf.

Al termine della *risposta principale* si osserva un transitorio incremento della desossi-Hb, probabilmente legato all'accumulo di sangue nel sistema di drenaggio venoso, che determina una caduta di segnale tardiva (*under-shoot*).

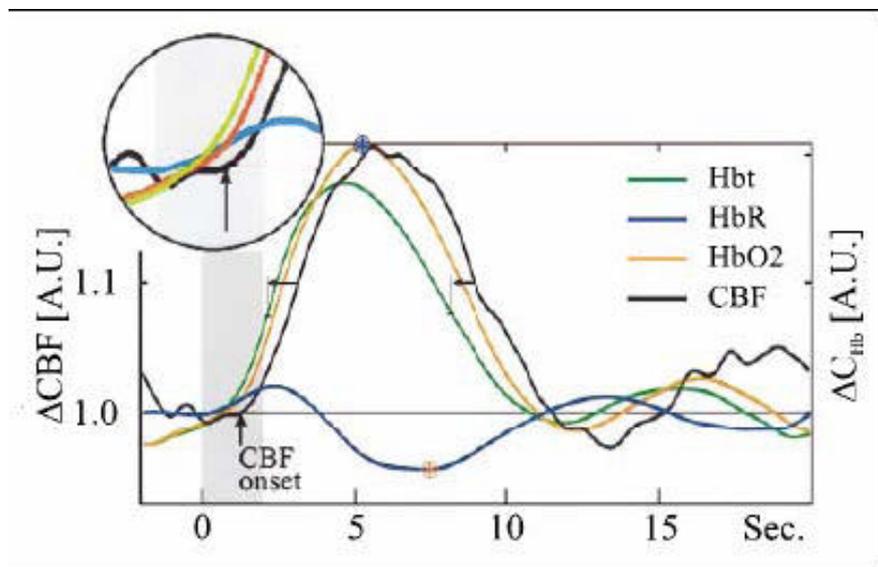


Fig. 3: Risposta emodinamica

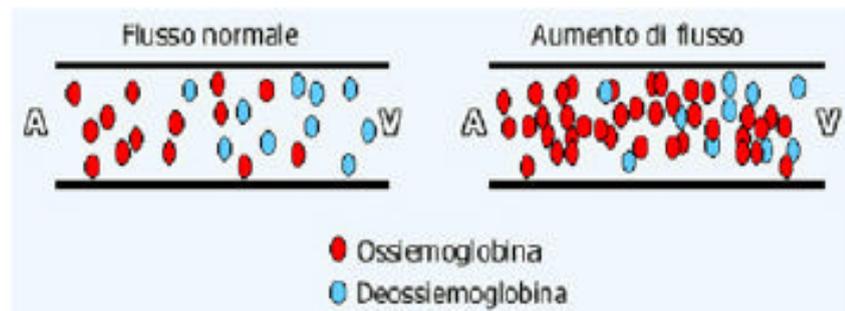


Fig. 4:: Variazione della concentrazione di Hb in un vaso afferente

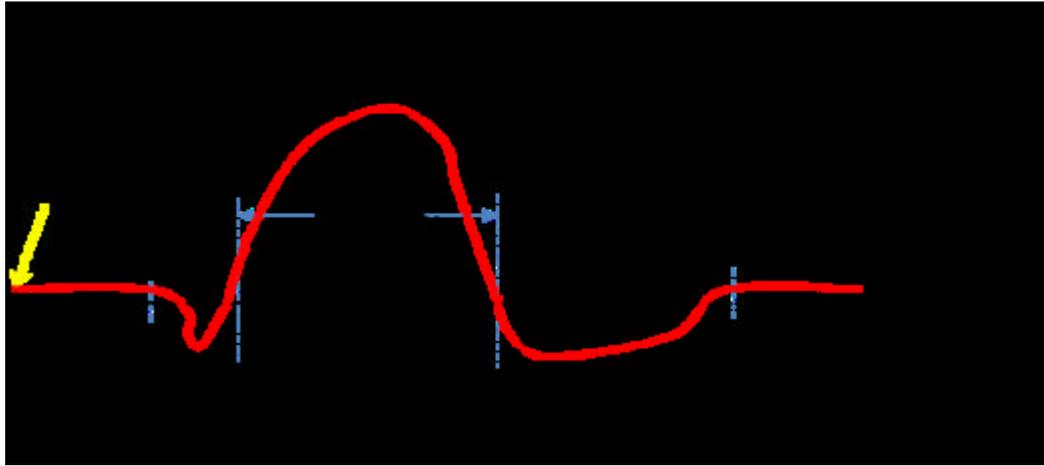


Fig. 5: Fenomeno BOLD, andamento del segnale in funzione del tempo.

1.4 Sequenze ecoplanari per RMf

L'introduzione della RMf è stata consentita dall'implementazione di sequenze RM idonee al campionamento delle variazioni di segnale legate all'effetto BOLD.

Principale requisito è rappresentato da un'elevata velocità di campionamento del segnale, sufficiente a coprire tutto l'encefalo in un intervallo di tempo uguale o inferiore a metà della durata della risposta emodinamica principale. Fondamentale a questo scopo è stata l'introduzione delle sequenze *ecoplanari* ad opera di P.Mansfield (1977).

La differenza tra le sequenze ecoplanari (EPI) e quelle cosiddette "convenzionali" risiede in un più efficiente riempimento del k -spazio: tutte le codifiche di fase necessarie ad acquisire uno strato vengono registrate durante un unico TR (tempo di ripetizione).

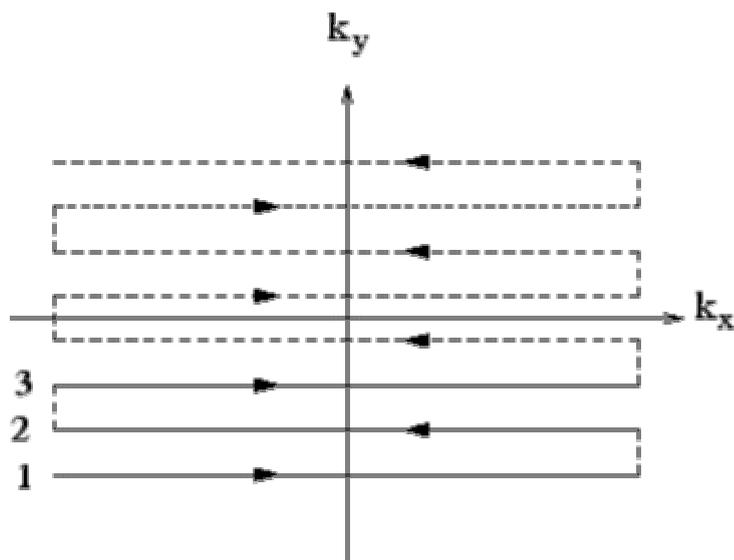


Fig 6.: : Schema rettangolare di riempimento del K spazio

Le sequenze EPI originarie presentano uno schema di campionamento del k-spazio di tipo rettangolare (fig 6). Attualmente sono disponibili sequenze EPI dotate di schemi di campionamento più complessi, il principale rappresentato da quello spirale, che consentono una maggiore risoluzione temporale, oltre ad una migliore risoluzione di contrasto.

Un ulteriore incremento della risoluzione temporale è reso possibile dalla implementazione della modalità *multi-slices* che consente di acquisire più strati durante lo stesso TR (nel caso della RMf tutti gli strati che costituiscono il volume di interesse vengono acquisiti in un TR).

Poiché le sequenze ad eco di gradiente sono le più sensibili alla disomogeneità locale del campo magnetico e quindi all'effetto di suscettività magnetica su cui si basa il contrasto BOLD, le sequenze comunemente usate in RMf sono GE-EPI (pesatura T2*).

1.5 Preprocessing dei dati funzionali

Sebbene le sequenze GE-EPI abbiano caratteristiche ottimali per il campionamento dell'effetto BOLD, i dati grezzi richiedono una preliminare elaborazione allo scopo di ridurre gli artefatti (alcuni insiti nel processo stesso di acquisizione) e per aumentare il rapporto segnale/rumore (intrinsecamente basso in relazione alla modesta entità della risposta BOLD a 1,5T).

Innanzitutto, data l'esistenza di un intervallo temporale minimo ma non nullo, tra l'acquisizione dei diversi strati che costituiscono il volume di interess, è necessario riallineare i dati ad uno stesso riferimento temporale (*slice scan time correction*). Questo viene generalmente realizzato attraverso algoritmi di interpolazione temporale.

Altro step importante è rappresentato dalla correzione degli artefatti da movimento. Il metodo più usato a questo scopo consiste nella coregistrazione dei volumi di dati acquisiti in tempi successivi con il volume iniziale attraverso trasformazioni di corpo rigido (traslazioni e rotazioni sui 3 piani dello spazio) e successiva interpolazione spaziale.

Per aumentare il rapporto segnale/rumore vengono in genere impiegati dei filtri spaziali che esaltano le variazioni di segnale che coinvolgono più voxel adiacenti a scapito delle variazioni isolate, più verosimilmente legate a rumore.

Il filtro gaussiano è un esempio di filtro spaziale.

Infine, allo scopo di eliminare sorgenti artefattuali di natura periodica (quali oscillazioni periodiche del campo magnetico, artefatti da respiro, artefatti da circolo, correnti parassite) possono essere applicati dei filtri temporali, passa alto o passa basso.

Poiché le sequenze GE-EPI hanno uno scarso dettaglio anatomico, in genere i dati funzionali vengono coregistrati con immagini anatomiche ad alta risoluzione acquisite durante la stessa sessione d'esame.

1.6 Paradigmi sperimentali

In genere la localizzazione di una specifica funzione cerebrale attraverso la RMf prevede l'attivazione della funzione di interesse attraverso una stimolazione esterna (visiva, uditiva, tattile, dolorifica). In base al *timing* della stimolazione si distinguono paradigmi *a blocchi* e paradigmi *ad evento singolo*.

Nel primo caso si alternano blocchi di attivazione (durante il quale il soggetto è sottoposto a stimoli ripetuti) e blocchi di riposo di uguale durata. In questo tipo di paradigma viene valutata la risposta complessiva agli stimoli ripetuti.

Nel secondo tipo di paradigma vengono applicati stimoli singoli, separati tra loro da intervalli di tempo sufficientemente lunghi da apprezzare le singole risposte emodinamiche.

Il paradigma a blocchi ha il vantaggio di determinare risposte ampie facilmente identificabili, tuttavia, nel caso di processi cognitivi che prevedono fenomeni di adattamento, è fondamentale l'utilizzo di paradigmi ad evento singolo (Fig. 7).

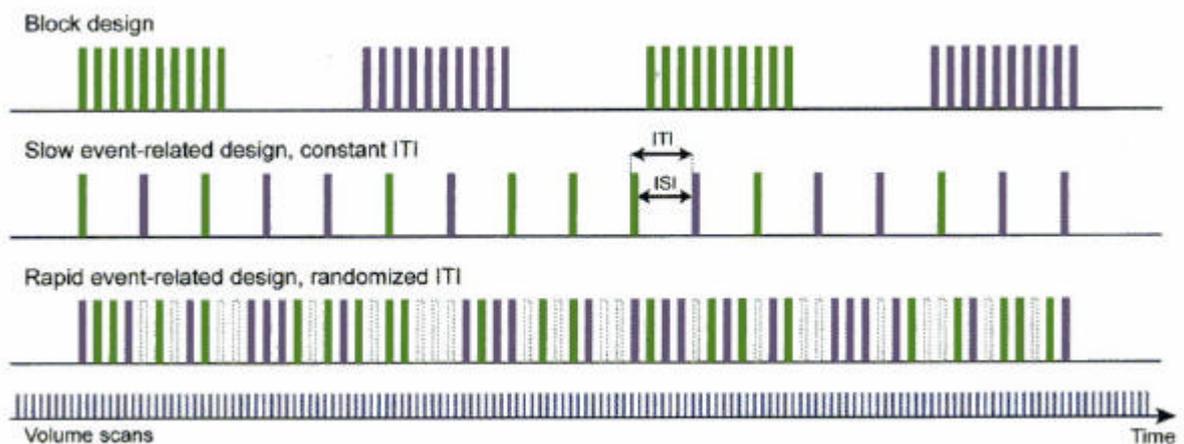


Fig. 7: Paradigma di stimolazione a blocchi.

CAPITOLO 2

Analisi statistica dei dati

La valutazione dell'attivazione cerebrale sulla base del contrasto BOLD richiede un'analisi statistica dei dati.

In ambito statistico è presente una grossa distinzione tra modelli inferenziali e non-inferenziali.

I primi richiedono la costruzione *a priori* di un modello di variazione del segnale mentre i secondi non necessitano di assunzioni aprioristiche ma si basano su leggi ricavate dalla Teoria dell'Informazione per analizzare il segnale.

2.1 Modello Generale Lineare

Il Modello Generale Lineare (GLM) è un modello statistico inferenziale di comune utilizzo in RMf.

Il GLM prevede la definizione di un segnale *atteso* costruito sulla base del paradigma sperimentale e dei corrispondenti *predittori*. Ogni predittore descrive il timing di un specifico stimolo. Nel caso più semplice è presente un unico predittore e il segnale atteso viene ottenuto da questo attraverso una correzione per la dinamica temporale della risposta emodinamica.

In altri casi il paradigma sperimentale prevede più predittori e il segnale *atteso* è dato dalla somma lineare dei singoli predittori, ciascuno corretto per la dinamica della risposta vascolare.

Il GLM confronta il *time course* del segnale *acquisito* in ogni voxel del volume di interesse con il segnale *atteso* attraverso un'analisi di varianza (ANOVA): i voxel in cui la varianza del segnale *acquisito* viene spiegata in manie-

ra significativa dalla varianza del segnale *atteso* sono rappresentati nella mappa statistica colorimetrica.

In genere la significatività statistica viene stabilita sulla base di una soglia corretta per confronti multipli (P corretta di Bonferroni, *P-Bonf*, o False Discovery Rate, *FDR*).

2.2 Analisi delle componenti indipendenti

L'Analisi delle componenti indipendenti (ICA) appartiene al gruppo dei modelli statistici non-inferenziali o descrittivi, che non richiedono la costruzione di modelli *a priori* del segnale e risultano indipendenti dal paradigma sperimentale e dai predittori.

La ICA parte dal presupposto che il segnale globale sia il risultato della combinazione lineare di n componenti (o sorgenti) di segnale tra loro statisticamente indipendenti. Il contributo di ciascuna sorgente al segnale di un certo voxel è espresso da un *coefficiente peso*. Il segnale globale registrato nel voxel è interpretato come la somma pesata delle n componenti indipendenti.

Ogni componente è identificata da uno specifico time course e da una mappa spaziale rappresentante i *coefficienti peso* corrispondenti.

Le componenti indipendenti vengono estratte *alla cieca* a partire dal segnale registrato. Il processo di estrazione sfrutta algoritmi iterativi di diverso tipo che si basano sulle diverse caratteristiche del segnale (distribuzione non-gaussiana) rispetto al rumore (distribuzione gaussiana).

CAPITOLO 3

L'attività cerebrale nello stato di riposo

3.1 Definizione

Numerosi studi funzionali hanno indagato l'attività cerebrale durante lo svolgimento di compiti cognitivi, sensoriali e motori, mentre l'indagine dello stato di riposo è relativamente recente. E' invece l'indagine dello stato di riposo.

Negli ultimi anni si è affermata tra i ricercatori l'ipotesi che a riposo il cervello sia impegnato in un'attività di fondo, definita in letteratura come *default mode of brain function* [17,27,52], *baseline state* [23], *conscious resting state* [5,47] o anche *stimulus independent thought* [48].

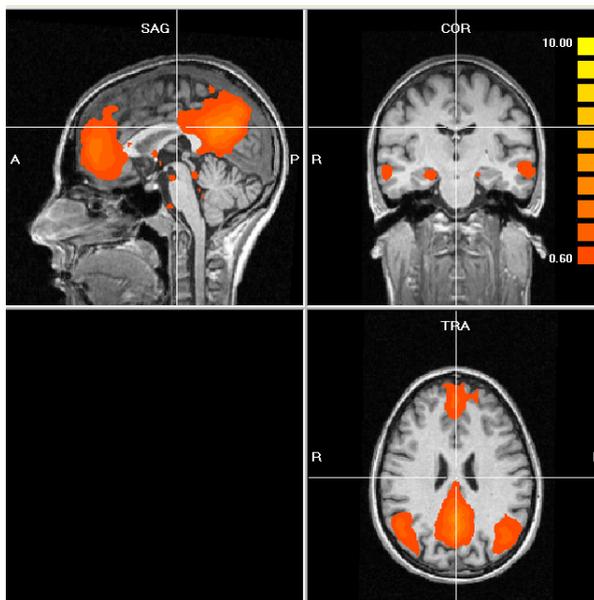


Fig. 8: Default-Mode-Network.

Le aree cerebrali coinvolte nell'attività di fondo costituirebbero una rete funzionalmente connessa, detta *default mode network* (DMN) (Fig. 8). Per **connettività funzionale** si intende l'esistenza di una correlazione tra la variazione di segnale in regioni diverse dell'encefalo. Questo non implica né l'esistenza di

una **connettività anatomica** (fibre nervose di connessione) né di una **connettività effettiva** (relazione di causa-effetto) [123].

I più importanti elementi della DMN sono la corteccia posteriore del cingolo / precuneo (PCC/Pcu), corteccia anteriore del cingolo (ACC), corteccia parietale infero-laterale (ILP) e corteccia temporale laterale (LT); resta meno chiaro il ruolo dell'ippocampo e del paraippocampo [66].

In condizioni di riposo, queste regioni mostrano sincrone fluttuazioni a bassa frequenza del segnale BOLD (<0,08 Hz, Low Frequency BOLD Fluctuations, LFBF) mentre la loro attività risulta inibita durante l'esecuzione di task. Tale **deattivazione** è stata osservata per un'ampia gamma di compiti cognitivi [2,22,24,47,54] ed è maggiore all'aumentare del carico cognitivo richiesto.

Anche se il ruolo fisiologico della DMN non è stato completamente chiarito, è importante osservare che questa rete comprende regioni corticali coinvolte nel processo di rievocazione/deposito della memoria [65, 66, 130] e nella coscienza del sé [113, 132, 133].

Sono state descritte alterazioni della DMN sia in pazienti con disturbi della memoria, in particolare con malattia di Alzheimer o MCI, sia in soggetti con disordini psichiatrici come la schizofrenia [102, 103], il disturbo da deficit dell'attenzione ed iperattività (ADHD) [104] e disturbi d'ansia [105].

Le prove più significative dell'esistenza della default mode network risiedono nella **riproducibilità** della rete nel singolo soggetto [59], nella **consistenza** della rete tra soggetti diversi, anche al variare del compito cognitivo [3,4,23,47,59] e nella **corrispondenza** delle aree corticali individuate con diverse metodiche di studio (PET, RMf) [13,17,23,61].

Esistono importanti prove a favore dell'origine neuronale della *default mode network*: la **localizzazione** della rete prevalentemente nella sostanza grigia (Fig.9) [3,13,17], la **corrispondenza** tra pattern di attivazione a riposo e regioni cerebrali correlate funzionalmente [3,11,14,38,39], la **modulazione** dell'attività della rete ad opera del carico cognitivo [25,49], la **lateralizzazione** stabile nei

singoli soggetti [14], la **correlazione** con la banda $\beta 2$ dell'EEG (17-23 Hz) [36], l'**alterazione** della rete in patologie neurologiche e psichiatriche.

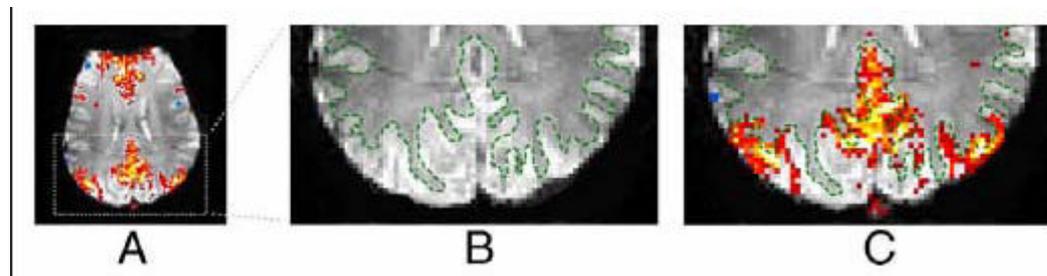


Fig. 9: Localizzazione corticale della default mode network; la linea verde tratteggiata indica il confine fra sostanza bianca e grigia.

3.2 Paradigmi sperimentali di studio

Il modo più semplice per indagare la DMN consiste nell'utilizzo di un paradigma sperimentale a blocchi, dove blocchi di attivazione (durante i quali viene chiesto al soggetto di svolgere compiti cognitivi) si alternano a periodi di riposo [99]. Questo tipo di paradigma consente una semplice analisi di deattivazione mediante il Modello Generale Lineare (GLM), ma la validità dei risultati è limitata dal tipo di compito cognitivo preso in esame e dalla performance individuale.

Un secondo metodo di indagine consiste nella valutazione della funzione cerebrale in condizioni di puro riposo. Questo tipo di approccio ha il vantaggio di garantire una completa indipendenza dei risultati dall'esecuzione del compito, ma richiede una complessa analisi statistica dei dati vista l'assenza di predittori a priori [83, 94, 97]. Infatti è richiesta un'analisi di connettività funzionale che valuti la correlazione tra variazioni di segnale in voxels diversi del cervello.

L'approccio più semplice all'analisi di connettività funzionale è costituito dal calcolo della correlazione lineare basata su voxel seme o su regione-di-

interesse [83, 94]; malgrado la sua semplicità questo approccio è fortemente dipendente dalla selezione a priori dei semi.

Un approccio più complesso, ma di validità più generale, è rappresentato dalla Analisi delle Componenti Indipendenti (ICA), un metodo statistico non-inferenziale che estrae multipli modelli spazio-temporali di connettività funzionale senza richiedere ipotesi a priori [89, 90].

La ICA permette virtualmente di estrarre tutte le sorgenti di segnale da un certo dataset, essendo totalmente indipendente da a priori spaziali (come le regioni di interesse) o temporali (come i predittori del segnale).

CAPITOLO 4

Malattia di Alzheimer¹

La Malattia di Alzheimer (MA) rappresenta la prima causa di demenza nella popolazione adulta colpendo il 10% dei soggetti di età superiore ai 65 anni e quasi il 50% dopo 85 anni [National Institute of Neurological Disorders and Stroke, <http://www.ninds.nih.gov/disorders/dementias>]. Nel 2001 più di 24 milioni di persone soffrivano di MA, numero destinato a duplicarsi nell'arco di 20 anni per l'aumentata aspettativa di vita, fino a raggiungere la previsione di circa 80 milioni per il 2040.

Originariamente il termine malattia di Alzheimer era riservato agli individui con esordio presenile dei sintomi e veniva distinto dalla demenza senile, termine utilizzato nei casi ad esordio dopo i 65 anni. I due termini sono stati successivamente raggruppati in un'unica entità patologica data l'analogia delle lesioni riscontrate all'anatomia patologica.

Dal punto di vista clinico la malattia di Alzheimer è una patologia lentamente progressiva, ad esordio insidioso, che colpisce preferenzialmente e precocemente la memoria a lungo termine. Altri deficit neurologici, quali disturbi del linguaggio, aprassia, agnosia, compromissione della capacità di giudizio e alterazioni dell'orientamento temporo-spaziale, compaiono in genere più tardivamente, anche se l'ordine di presentazione può variare.

Il quadro conclamato di demenza è in genere preceduto da quadri sfumati di compromissione di singole sfere cognitive. Sono stati descritti cinque tipi di quadri isolati:

¹Il testo di riferimento è Allan H. Ropper, Robert H. Brown, *Adams e Victor - Principi di Neurologia*, McGraw Hill 1997.
Alzheimer's disease K. Blennow, M.J. de Leon, H Zetterberg- *Lancet*; 2006.

1- lo stato amnesico di Korsakoff, caratterizzato da un deficit sproporzionato della memoria ritentiva, con integrità delle altre capacità cognitive;

2-la disnomia, ovvero l'incapacità di ricordare i nomi, inizialmente limitata ai nomi propri e successivamente estesa ai nomi comuni, fino a determinare una seria compromissione della fluidità del discorso;

3- il disorientamento spaziale;

4-la paranoia e altri disturbi della personalità;

5-i disturbi dell'andatura.

L'eziologia della MA è sconosciuta anche se sono stati identificati alcuni fattori di rischio quali età, familiarità e polimorfismo Apo e4.

Alcuni studi hanno evidenziato correlazioni tra MA e numerose situazioni patologiche (traumi cranici, patologia cerebrovascolare, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa, aterosclerosi, patologia ischemica coronaria, fumo, obesità e diabete) tuttavia non è chiaro se questi fattori contribuiscano alla patogenesi della MA o se, inducendo sofferenza cerebrovascolare, trasformino una condizione subclinica in una clinicamente manifesta.

La patogenesi della MA è legata alla formazione di agglomerati neurofibrillari intraneuronali e alla deposizione di placche β amiloidi nello spazio extracellulare e nella parete vasale. I processi metabolici che portano alla formazione di queste lesioni e il loro rapporto con gli aspetti clinici della malattia sono ancora in discussione.

La proteina precursore dell'amiloide (APP Amyloid Precursor Protein) è una proteina transmembrana, di funzione sconosciuta, che viene clivata in sequenza da tre enzimi, α - β - e γ secretasi. Lo squilibrio tra la produzione e la clearance dell'APP nel cervello rappresenta un importante meccanismo patogenetico. A sostegno di questa ipotesi c'è l'osservazione che mutazioni implicate nella forma familiare di MA sono localizzate nel gene dell'enzima chiave per la pro-

duzione di APP (presenilina) e nel gene stesso dell'APP, in corrispondenza delle regioni bersaglio della secretasi. Inoltre alcune forme familiari di MA presentano una duplicazione del locus APP e pazienti con Sindrome di Down, che sovraesprimono l'APP in seguito alla trisomia 21, sviluppano precocemente placche amiloidi. La forma solubile della proteina amiloide subisce una variazione conformazionale a foglietto β (amiloide β , A β), che spiega la sua aggregazione in oligomeri e in fibrille insolubili a formare placche. Non solo la deposizione di placche ma anche oligomeri A β possono avere un effetto neurotossico.

Quasi in contemporanea con la scoperta dell'A β nelle placche, fu dimostrato che i grovigli erano composti da una forma anormalmente fosforilata di proteina tau. La proteina tau è una normale proteina assonale che lega i microtubuli, promuovendo il loro assemblaggio e la loro stabilità. La fosforilazione della proteina tau è regolata dall'equilibrio tra molteplici chinasi e fosfatasi. La iperfosforilazione nella MA inizia in sede intracellulare e porta al sequestro della proteina tau e di altre proteine associate ai microtubuli, causando la distruzione dei microtubuli e danneggiando il trasporto assonale. La proteina tau tende ad aggregarsi in fibrille insolubili e quindi in grovigli compromettendo infine la funzione neuronale.

Probabilmente il processo neurodegenerativo della malattia di Alzheimer inizia 20-30 anni prima dell'esordio clinico. Secondo questa ipotesi nella fase preclinica si ha un progressivo accumulo di placche amiloidi e di grovigli neurofibrillari che si manifesta clinicamente solo quando il carico lesionale supera un valore limite.

Negli ultimi vent'anni sono stati fatti grandi progressi nell'identificazione delle alterazioni strutturali e biochimiche connesse alla MA, tuttavia, al momento attuale, la diagnosi si basa essenzialmente su criteri clinici (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disease Association, NINCDS-ADRDA criteria*) [53] ed è caratte-

rizzata da un certo grado di incertezza, essendo possibile una diagnosi definitiva solo attraverso l'esame istologico post-mortem.

Criteri diagnostici NINCDS-ADRDA modificati da B.Dubois, H.H.Feldman, C.Jacova.

Secondo i criteri NINCDS-ADRDA modificati, per ricevere una ***diagnosi di probabile malattia di Alzheimer***, il paziente deve rispettare il criterio A e almeno uno dei criteri associati B,C,D o E. Il primo criterio è il cosiddetto '**Core diagnostic criterion**' (ovvero il criterio A o cardine diagnostico), che contempla il precoce indebolimento della memoria episodica.

In particolare il criterio A recita:

Presenza di precoce e significativo indebolimento della memoria episodica, che include i seguenti aspetti:

1. Cambiamento graduale e progressivo della funzione mnemonica riscontrato dal paziente o da altri.
2. Evidenza oggettiva di indebolimento della memoria episodica emerso nei tests: questo consiste generalmente nella difficoltà a richiamare informazioni. Difficoltà che non si risolve neanche con suggerimenti o ripetendo le prove e dopo che sia stata preliminarmente dimostrata la capacità di codifica dell'informazione.
3. L'indebolimento della memoria episodica può essere isolato oppure associarsi ad altri deficit al momento dell'instaurarsi della MA o nella sua evoluzione.

Aspetti associati

B. Presenza di atrofia del lobo temporale mediale

- Perdita di volume nell'ippocampo, corteccia entorinale, amigdala evidenziata allo studio RMN funzionale basato sugli aspetti visivamente evidenti (riferendosi a ad una popolazione ben caratterizzata e normalizzata per età)

C. Anormalità del biomarker liquido cerebrospinale

- Bassa concentrazione dell'amiloide β 1-42, aumento della concentrazione totale tau, o aumentata concentrazione fosfo-tau, o la combinazione di queste tre.

D. Specifico aspetto al neuroimaging funzionale PET

- Riduzione del metabolismo del glucosio nelle regioni temporo-parietali bilateralmente.

E. Dimostrata familiarità per mutazione autosomica dominante MA.

Criteri di esclusione

Anamnesi

- Esordio improvviso
- Precoce comparsa dei seguenti sintomi: disturbi della deambulazione, convulsioni, alterazioni del comportamento.

Caratteristiche cliniche

- Segni neurologici focali come emiparesi, perdita dei sensi, deficit del campo visivo

- Precoci segni extrapiramidali

Altre patologie organiche abbastanza severe da spiegare le alterazioni della memoria e i sintomi associati

- Non demenza di Alzheimer
- Depressione maggiore
- Patologia cerebrovascolare
- Malattie tossico-metaboliche che richiedano specifiche indagini
- Anormalità di segnale RMN FLAIR o T2, a carico del lobo temporale mediale riconducibili a insulti infettivi o vascolari

Criteri diagnostici per MA definito

La malattia di Alzheimer è definita certa se sono presenti i seguenti:

- Evidenza clinica e istopatologica di malattia (biopsia cerebrale o autopsia), come richiesto dai criteri NIA-Reagan per la diagnosi post-mortem di MA; devono essere presenti entrambi i criteri.
- Evidenza clinica e genetica di MA (mutazione dei cromosomi 1, 14, o 21); devono essere presenti entrambi i criteri.

La diagnosi clinica è particolarmente difficile negli stadi precoci di malattia, poichè lievi deficit cognitivi sono molto comuni nella popolazione generale [64, 118].

Gli esami neuroradiologici convenzionali, TAC e RMN, giocano un ruolo minore nella diagnosi di MA e servono essenzialmente per escludere cause secondarie di demenza.

Le nuove conoscenze sui meccanismi patogenetici della MA e la prospettiva di farmaci efficaci in fase iniziale o addirittura preclinica, hanno dato vita ad un'intensa ricerca di marcatori precoci di malattia e nuovi criteri diagnostici.

CAPITOLO 5

Mild Cognitive Impairment (MCI)²

Il Mild-Cognitive-Impairment (MCI) è un'entità clinica di recente introduzione con cui si identificano lievi disturbi cognitivi (lamentati dal paziente o dai familiari e confermati dai tests neuropsicologici) che non compromettono significativamente la vita quotidiana.

Nella popolazione tra i 65 e gli 85 anni il MCI ha una prevalenza circa doppia rispetto alla MA, anche se in letteratura sono riportati dati discordanti in relazione ai diversi criteri diagnostici impiegati [122].

Il termine MCI raggruppa condizioni eterogenee con prognosi molto variabile: nella maggior parte dei soggetti i sintomi regrediscono o restano stabili a lungo ma nel 15% dei casi si assiste alla progressione verso la malattia di Alzheimer [119, 120, 121, 122]; un gruppo minore di pazienti sviluppa forme di demenza diverse dalla MA.

I soggetti con MCI sono ulteriormente classificati in relazione alla tipologia del deficit cognitivo.

In particolare, sulla base della presenza o meno di disturbi della memoria i pazienti vengono suddivisi in *amnesic* e *non-amnesic*. I soggetti appartenenti al sottogruppo *amnesic* sono quelli a più alto rischio di progressione verso la MA. Un'ulteriore distinzione viene fatta in base al coinvolgimento di uno o più domini cognitivi, rispettivamente *single-domain* e *multi-domain* MCI.

Al momento non esiste una definizione comunemente accettata e criteri diagnostici condivisi. Questo spiega in parte i risultati contraddittori riportati in letteratura. La distinzione fra pazienti con MCI e soggetti anziani normali può

²Il testo di riferimento è Allan H. Ropper, Robert H. Brown, Adams e Victor - *Principi di Neurologia*, McGraw Hill 1997.

Alzheimer's disease K. Blennow, M.J. de Leon, H Zetterberg- *Lancet*; 2006.

essere difficile, dal momento che le alterazioni della memoria e delle capacità cognitive possono essere molto sfumate.

CAPITOLO 6

Diagnosi precoce di malattia di Alzheimer: un metodo per la valutazione dell'attività cerebrale a riposo basato sull'ICA.

Distinguere la MA in stadio precoce dal MCI o dal fisiologico decadimento senile attraverso semplici criteri clinici appare estremamente arduo; ancora più difficile è predire il rischio di progressione da MCI a MA [64, 118].

La diagnosi precoce di MA rimane un obiettivo fondamentale per le sue implicazioni terapeutiche. Infatti sia le terapie farmacologiche che quelle riabilitative sono più efficaci negli stadi iniziali della patologia, quando il carico lesionale è ridotto [118].

Molti studi di neuroimaging hanno tentato di individuare dei marcatori precoci, morfologici o funzionali, di MA, allo scopo di definire nuovi criteri diagnostici. Numerosi studi di risonanza magnetica funzionale hanno indagato le alterazioni della cosiddetta Working-Memory Network [93, 95, 106, 107, 109], cioè quella rete neuronale attivata durante compiti che richiedono il coinvolgimento della memoria a breve termine.

Recentemente alcuni autori hanno focalizzato la loro attenzione sulla cosiddetta Default-Mode-Network (DMN) [65, 66, 67].

In base a quanto riportato in letteratura, pazienti affetti da MA presentano un'alterata attivazione della componente cingolata posteriore (PCC) della DMN [66, 92]. Alcuni autori hanno segnalato anche una ridotta attività dell'ippocampo [66, 94].

6.1 Obiettivi

In questo studio abbiamo utilizzato la risonanza magnetica funzionale allo scopo di individuare un marker precoce di MA. In particolare abbiamo analizzato l'attività cerebrale in condizioni di puro riposo in pazienti affetti da MA, in soggetti con MCI e in soggetti sani di pari età.

6.2 Materiali e Metodi

Soggetti: abbiamo reclutato 17 controlli anziani (68.7 ± 7.3 anni, età media \pm deviazione standard), 12 pazienti con MCI (71.8 ± 5.6 anni) e 12 pazienti con MA (73.3 ± 4.6 anni). I gruppi non differivano significativamente per età o livello di educazione (one-way ANOVA, Turkey HSD Test).

Nei soggetti di controllo sono stati esclusi disturbi neurologici o psichiatrici maggiori e l'esame RM convenzionale non documentava significative alterazioni.

I pazienti con MCI e con MA sono stati sottoposti ad un'accurata valutazione neuropsicologica attraverso il Mini-Mental-Status-Examination (MMSE), la Clinical Dementia Rate scale (CDR scale) e tests neuropsicologici mirati all'indagine di singoli cognitivi (memoria, prassia, attenzione, astrazione e linguaggio).

La diagnosi di malattia di Alzheimer è stata formulata in base ai criteri *NINCDS-ADRDA* (appendice B). I pazienti sono stati suddivisi in due sottogruppi sulla base del punteggio CDR, rispettivamente CDR 0,5 (5 soggetti) e CDR 1 (7soggetti).

La diagnosi di Mild Cognitive Impairment (MCI) è stata formulata in accordo coi *criteri di Petersen modificati* [1]. Tutti i soggetti appartenevano alla variante amnestica MCI: 9 soggetti presentavano un deficit isolato della memoria

(single-domain amnesic MCI) mentre 3 mostravano deficit in multipli domini cognitivi (multi-domain amnesic MCI). Tutti i pazienti MCI avevano un punteggio CDR di 0,5.

Paradigma sperimentale: Durante la registrazione ai pazienti è stato semplicemente chiesto di rimanere fermi e rilassati, ad occhi chiusi

Acquisizione dei dati: l'esame RM è stato eseguito in uno scanner da 1.5 T (Maestro Symphony, Siemens).

I dati funzionali sono stati ottenuti attraverso sequenze EPI ad echo di gradiente T2* pesate (TR/TE/FA 2100ms/60ms/90°, TR delay 20ms, FOV 22cm, matrix 64x64, voxel 3,4x3,4x5mm³, gap 1,25mm). Abbiamo acquisito 20 fette assiali oblique, parallele al piano passante per le commissure anteriore e posteriore, dal polo occipitale fino al vertice. Sono stati acquisiti 60 volumi, con un tempo totale di scansione di 2 minuti e 28 secondi.

I dati anatomici sono stati acquisiti con sequenze T1 MP-RAGE 3D (TR/TI/TE/FA 2160ms/1100ms/3,93ms/10°, voxel 1x1x1,4 mm³, gap 0,7mm). Sono state acquisite 160 fette oblique sagittali in un tempo di scansione totale di 6 minuti e 28 secondi.

Analisi dei dati: per l'analisi dei dati sono stati utilizzati il software BrainVoyager QX 1.8 e alcuni algoritmi che abbiamo implementato con MatLab 6.5.

I dati funzionali sono stati preliminarmente processati allo scopo di aumentare il rapporto segnale/rumore e ridurre artefatti. In particolare abbiamo realizzato una *slice scan time correction* attraverso una interpolazione *sinc*, una correzione 3D del movimento attraverso trasformazioni di corpo rigido (lo spostamento stimato in ogni direzione è stato inferiore a 3 voxels in tutti i soggetti)

e uno *smoothing* spaziale con un kernel gaussiano di 4mm FWHM (Full-Width-Half-Maximum).

I dati anatomici sono stati interpolati per ottenere voxels isometrici di $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ ed in seguito sono stati normalizzati allo spazio standard di Talairach (Fig.10).

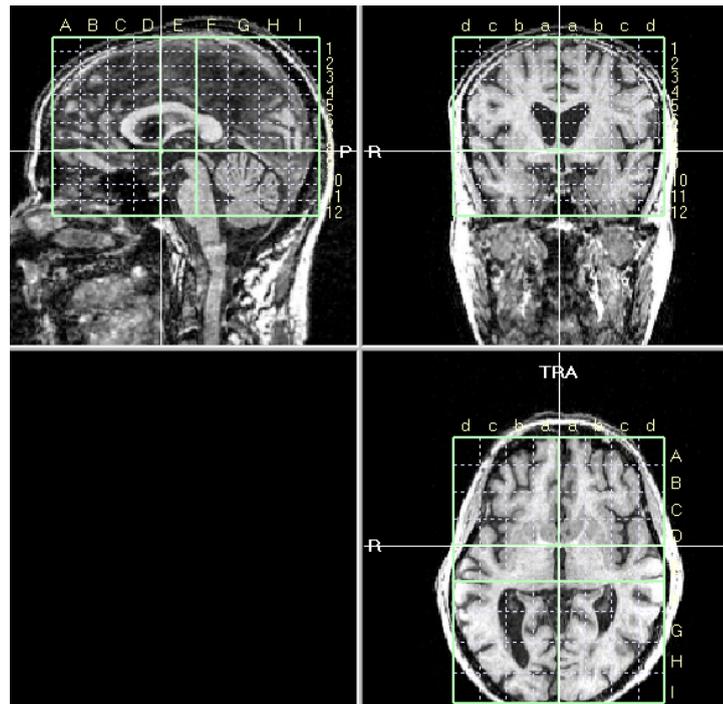


Fig. 10. : Spazio anatomico 3D normalizzato in spazio di Takirach.

I dati anatomici e funzionali sono stati co-registrati attraverso rotazioni, traslazioni e zoom nei 3 assi dello spazio (Fig. 11).

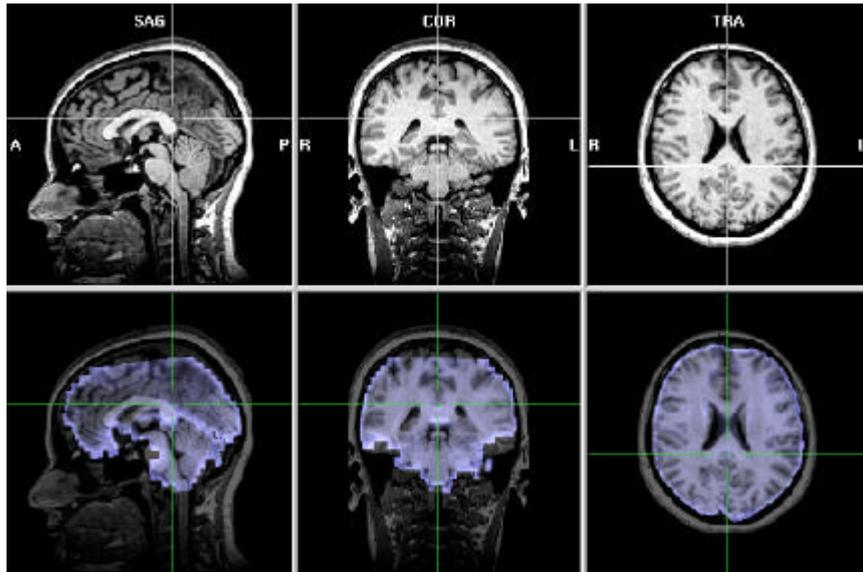


Fig. 11: Coregistrazione dei dati anatomico-funzionali. L'immagine anatomica ad alta risoluzione è mostrata in trasparenza al di sotto dell'immagine funzionale.

I dati funzionali processati sono stati elaborati attraverso una ICA con condizioni di indipendenza imposte nel dominio spaziale, s-ICA (analisi delle componenti spazialmente indipendenti).

Per ridurre il carico computazionale di questo passaggio, i voxel extra-encefalici sono stati eliminati dalle successive elaborazioni attraverso la creazione semiautomatica di una “maschera” (Fig. 12).

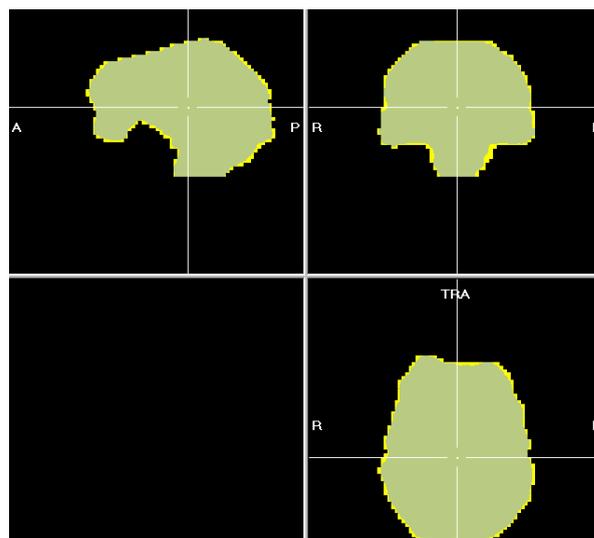


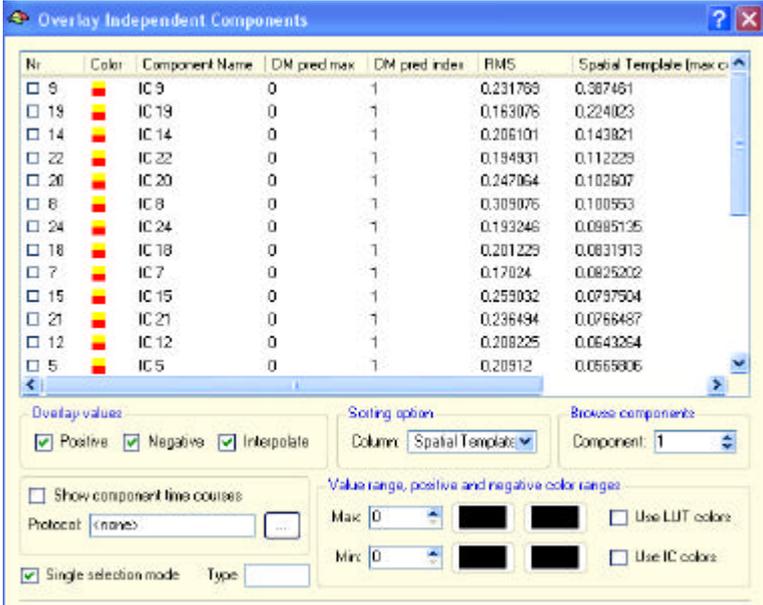
Fig.12: La costruzione di una maschera (mostrata in figura) è un passaggio preliminare fondamentale per l'esecuzione dell'analisi delle componenti indipendenti, che altrimenti sarebbe troppo complessa da un punto di vista computazionale.

Inoltre la dimensionalità dei dati è stata ridotta attraverso l'esecuzione preliminare di un'Analisi delle Componenti Principali.

La ICA realizza una decomposizione *cieca* del segnale complessivo in multiple sorgenti di segnale [89,90], ipotizzando che tutte le sorgenti del segnale siano indipendenti, che le sorgenti abbiano una distribuzione super-gaussiana tranne una e che il numero di segnali registrati (i.e. voxels) sia maggiore del numero delle sorgenti (i.e. numero di componenti estratte).

In questo studio abbiamo impiegato un algoritmo ICA deflation (FAST-ICA) che massimizza la negantropia del segnale registrato per estrarre le componenti informative.

Ogni gruppo di dati è stato scomposto in 30 componenti spazialmente indipendenti (ICs), ciascuna rappresentata da una mappa spaziale associata ad uno specifico time-course (ciascuna mappa spaziale riporta il contributo relativo della specifica componente al segnale complessivo in ogni voxel; i coefficienti peso sono convertiti in valori-Z per consentirne la rappresentazione in mappe colorimetriche). Nella visualizzazione delle mappe abbiamo applicato una soglia-Z di 2,5 e una soglia di cluster di 10 (Fig.13).



Nr	Color	Component Name	DM pred max	DM pred index	RMS	Spatial Template (max)
<input type="checkbox"/> 9		IC 9	0	1	0.231769	0.387461
<input type="checkbox"/> 19		IC 19	0	1	0.163076	0.224023
<input type="checkbox"/> 14		IC 14	0	1	0.206101	0.143821
<input type="checkbox"/> 22		IC 22	0	1	0.194931	0.112229
<input type="checkbox"/> 20		IC 20	0	1	0.247064	0.102607
<input type="checkbox"/> 8		IC 8	0	1	0.309076	0.100563
<input type="checkbox"/> 24		IC 24	0	1	0.193246	0.0985135
<input type="checkbox"/> 18		IC 18	0	1	0.201229	0.0831913
<input type="checkbox"/> 7		IC 7	0	1	0.17024	0.0825202
<input type="checkbox"/> 15		IC 15	0	1	0.259032	0.0797904
<input type="checkbox"/> 21		IC 21	0	1	0.236494	0.0766487
<input type="checkbox"/> 12		IC 12	0	1	0.208225	0.0643254
<input type="checkbox"/> 5		IC 5	0	1	0.20912	0.0658006

Fig.13: La ICA ha prodotto 30 componenti indipendenti.

In letteratura sono stati proposti numerosi metodi per stabilire l'esatto numero di sorgenti [131, 132, 133, 134] ma il dibattito resta ancora aperto. In questo lavoro abbiamo deciso di utilizzare un criterio euristico di comune impiego nell'ambito del neuroimaging: abbiamo osservato e confrontato accuratamente le sorgenti estratte con numeri diversi di ICs al fine di evitare sopra- o sottostime (ovvero l'aggregazione di sorgenti diverse o la frammentazione di una singola sorgente), infine abbiamo deciso di estrarre 30 componenti per ogni dataset. La metodica ICA ha consentito di ridurre le interferenze da parte di artefatti da movimento, da respiro o da circolo, poichè queste sorgenti di segnale sono state segregate in distinte ICs [124, 125, 126].

Allo scopo di selezionare la componente relativa alla DMN fra le 30 ICs estratte dall'algoritmo fast-ICA, abbiamo impiegato un template ricavato da 10 soggetti giovani sani.

Template della DMN (Fig.14): 10 soggetti giovani sani (28 ± 7 anni, età media \pm deviazione standard) sono stati sottoposti all'esame di RMf nelle stesse condizioni dei pazienti e i dati ottenuti sono stati pre-processati come appena discusso. Le ICs originate dai 10 volontari sono andate incontro ad un'analisi di Self-Organizing-Clustering (SOC) [66], un'analisi di gruppo di recente introduzione che riunisce componenti omologhe di distinti soggetti sulla base della reciproca somiglianza spaziale. Sono stati estratti 30 gruppi e sono state calcolate le corrispondenti mappe medie.

Dopo aver escluso i voxel con coefficienti di peso negativi, la mappa media di gruppo corrispondente alla DMN è stata adottata come template [65, 66].

Il template della DMN ha consentito la creazione di un indice quantitativo di connettività funzionale.

Per ogni soggetto abbiamo calcolato la correlazione spaziale tra ogni mappa estratta dalla s-ICA e la mappa del template, attraverso uno script di MatLab che confronta i coefficienti peso di voxel in posizioni spaziali omobghe. Selezionando la componente con il più alto coefficiente di correlazione spaziale

è stato possibile ottenere un indice individuale di connettività relativa al modello (template), denominato *relative DMN (r-DMN) connectivity*.

Analisi statistica tra gruppi: Per il confronto tra i valori di *relative DMN connectivity* nei pazienti con MA-CDR 0.5, con MA-CDR 1, nei soggetti con MCI e nei controlli anziani è stato eseguito un test one-way ANOVA per campioni indipendenti, seguito da un test di Turkey HSD (Honestly Significant Difference, HSD).

6.3 Risultati

I pazienti con MA-CDR 1 hanno mostrato un valore di r-DMN significativamente inferiore rispetto ai controlli anziani sani ($p < 0.01$, HSD=0.16) ai soggetti con MCI ($p < 0.01$, HSD=0.16) ed ai pazienti con MA-CDR 0,5 ($p < 0.01$, HSD=0.16); un punteggio inferiore a 0.25 ha consentito di identificare i pazienti con MA CDR 1 in modo molto specifico (fig.15).

I soggetti con MA-CDR 0.5 non hanno mostrato differenze significative rispetto ai controlli anziani o ai pazienti MCI.

La r-DMN nei pazienti con MCI era tendenzialmente maggiore rispetto ai controlli anziani ma senza raggiungere una soglia significativa. Va sottolineato che i valori di connettività relativa di questo gruppo sono stati caratterizzati dalla più alta deviazione standard.

Non abbiamo riscontrato una significativa correlazione tra i valori di r-DMN e il MMSE o il punteggio dei test neuropsicologici.

6.4 Discussione

Questo studio ha evidenziato il ruolo potenziale della RMf nella gestione dei pazienti affetti da deficit di memoria. In particolare abbiamo identificato un marker di MA-CDR1 che si è dimostrato efficace nel distinguere questi pazienti sia dai controlli sani che dai soggetti MCI. Avendo eseguito un'analisi non inferenziale (ICA) nel puro stato di riposo, i nostri risultati non sono stati influenzati né da variabili connesse all'esecuzione del compito cognitivo, né dalla selezione di regioni di interesse, e tutti i passaggi sono stati condotti in modo automatico.

Sfortunatamente il nostro metodo non è stato in grado di distinguere i pazienti con MA-CDR 0,5 dai controlli anziani e dai soggetti con MCI. Ipotizziamo che in questi pazienti siano presenti piccole alterazioni locali della connettività della DMN, tali da oltrepassare la capacità di detezione dell'indice r-DMN. Infatti tale parametro fornisce una valutazione globale dell'attività di rete ma probabilmente non evidenzia in maniera adeguata sfumate differenze regionali.

Per quanto riguarda i soggetti MCI, questi hanno mostrato valori di r-DMN molto eterogenei. Per verificare se l'alta variabilità dei punteggi r-DMN in questo gruppo riflette un diverso rischio di evoluzione verso la malattia di Alzheimer è necessaria una valutazione longitudinale.

In questo gruppo non abbiamo riscontrato una correlazione significativa tra i valori r-DMN e la gravità del deficit cognitivo evidenziato al MMSE e ai test neuropsicologici, né nei pazienti con MA né in quelli con MCI. Anche in questo caso è possibile ipotizzare che siano necessarie valutazioni regionali al fine di svelare associazioni con deficit di specifici domini cognitivi. Questo tipo di analisi potrebbe fornire nuove informazioni riguardo alla fisiologia della DMN.

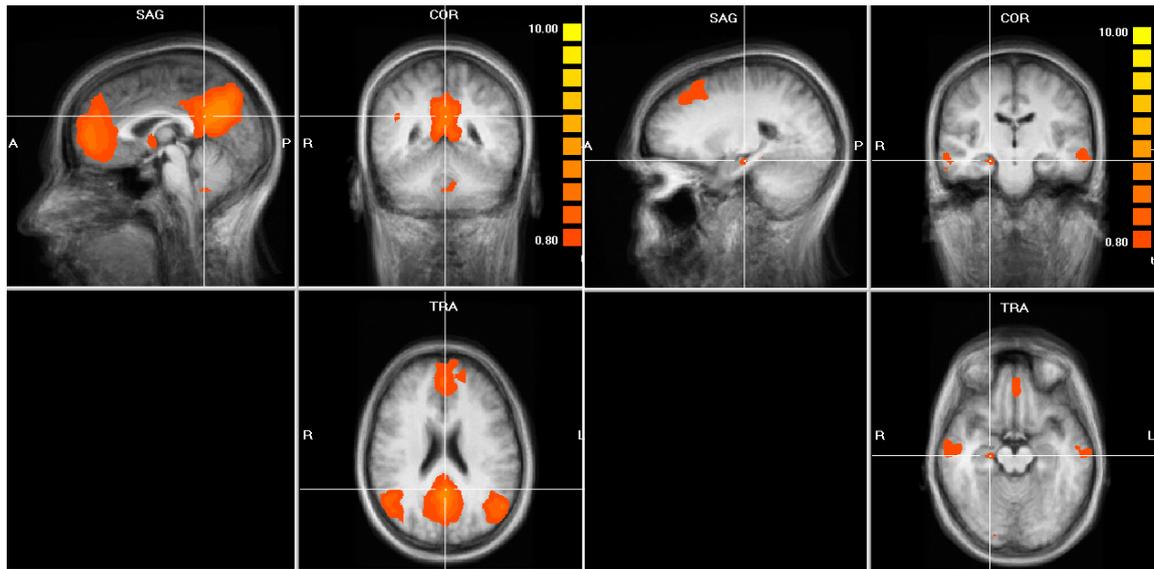
Oltre all'individuazione di indici regionali di connettività, la sensibilità e la specificità del metodo potrebbe essere aumentata ottimizzando il protocollo di

acquisizione e migliorando il campionamento della DMN (i.e. scansioni funzionali prolungate, risoluzione temporale maggiore).

Concludendo, oggi le profonde conoscenze sulla patogenesi della MA, in particolare l'evidenza che il danno cerebrale inizia molto prima dell'esordio clinico della malattia, hanno incoraggiato un'intensa ricerca di biomarker di MA che consentano la diagnosi precoce o in fase preclinica, aumentando le possibilità di arrestare o far regredire farmacologicamente il processo patogenetico attraverso la terapia [118].

In questo lavoro abbiamo proposto una tecnica RMf per la diagnosi precoce di malattia di Alzheimer. Il nostro metodo si è dimostrato efficace nel discriminare i pazienti con MA-CDR 1 dai pazienti con MA-CDR 0,5, dai controlli anziani e da soggetti con MCI, ma non è riuscito a discriminare i pazienti con MA-CDR 0,5 né dai controlli né dai pazienti MCI.

Poiché la classificazione in gruppi (Fig. 16) (MCI, MA-CDR0,5 e MA-CDR1) è basata essenzialmente su criteri clinici che soffrono di una bassa specificità [64, 118], risulta fondamentale una valutazione longitudinale per verificare l'accuratezza dei criteri funzionali rispetto a quelli clinici e per rivelare il loro potenziale potere prognostico. Una valutazione longitudinale nel tempo è necessaria anche per determinare l'eventuale ruolo di questa tecnica nella diagnosi di MA in stadio preclinico.



A

B

Fig.14: DMN template ottenuto da controlli giovani sani (A: $x=126,y=177,z=105$; B: $x=107,y=146,z=141$; $t-t$ 0.8). Esso include la Corteccia Anteriore del Cingolo (ACC), la Corteccia Posteriore del Cingolo /Precuneo (PCC/Pcu), corteccia Parietale Inferiore, corteccia Temporale-Laterale, Ippocampo e Paraippocampo. Sono stati esclusi i voxels con correlazione negativa con i time-course componente.

2D Graph 2

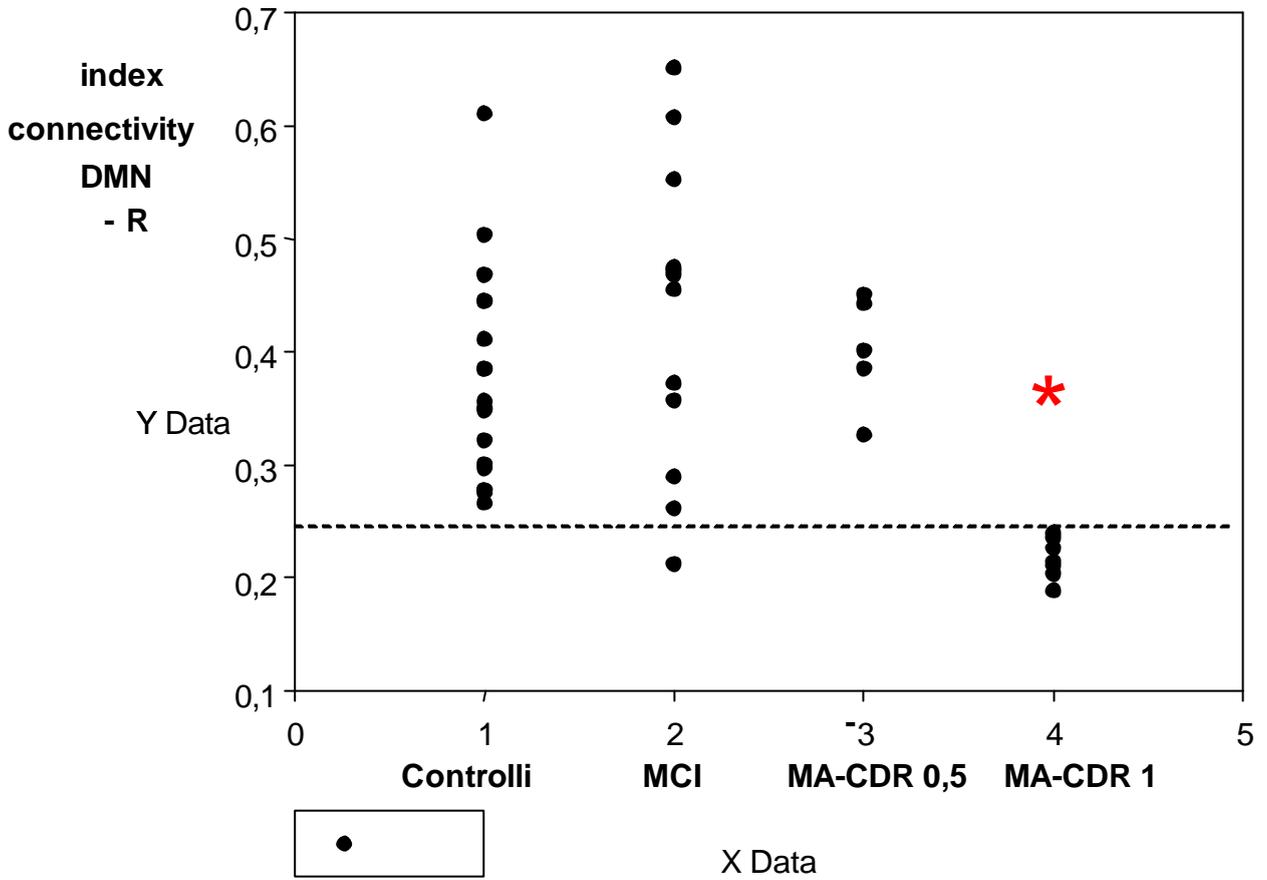
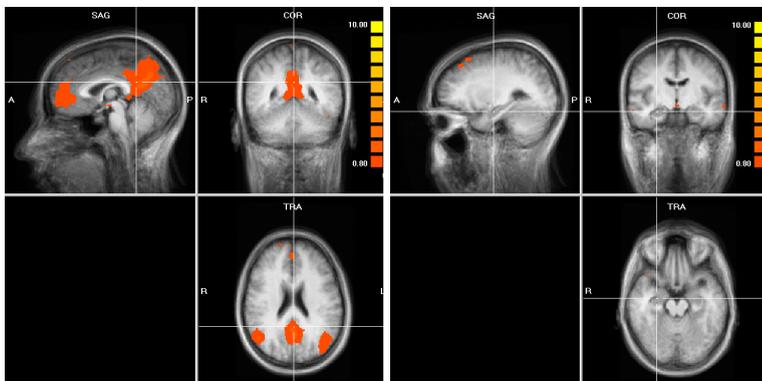
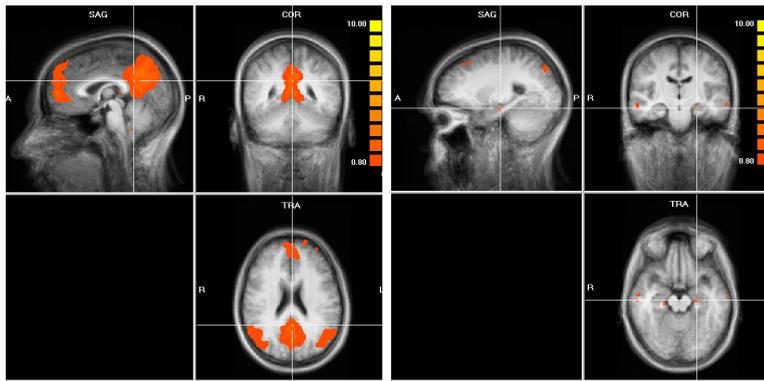


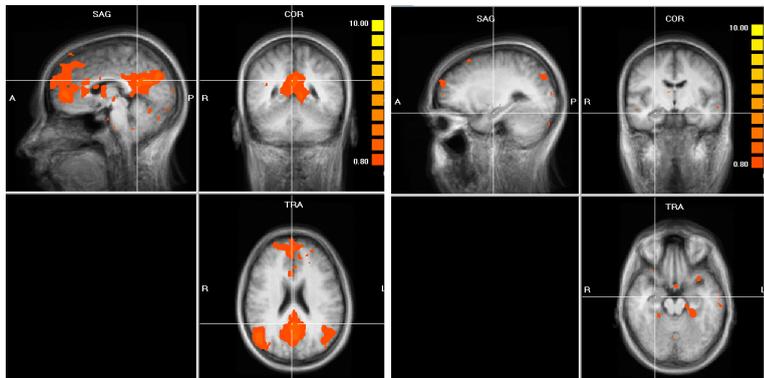
Fig. 15: Scatter plot. I valori di connettività DMN sono riportati sull'asse y. I pazienti MA-CDR 1 differiscono significativamente sia dagli MCI ($p < 0.01$, $HSD = 0.16$) che dai controlli anziani sani ($p < 0.01$, $HSD = 0.16$). I soggetti con MA-CDR 0,5 non si differenziano significativamente né dai controlli anziani né dai soggetti MCI. One-way ANOVA for independent samples with subsequent Turkey HSD test.



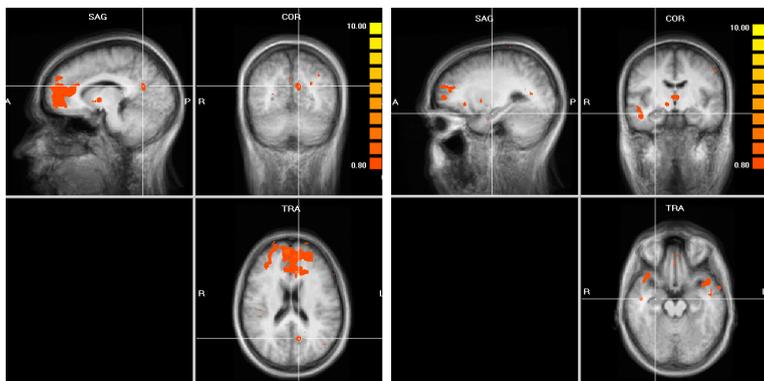
A



B



C



D

Fig. 16: Mappe DMN di gruppo (soglia-t 0.8). Controlli anziani (A; $x=126, y=177, z=105$), MCI (B; $x=126, y=177, z=105$), MA-CDR 0,5 (C; $x=126, y=177, z=105$) e MA-CDR 1 (D; $x=137, y=188, z=109$). Ad un esame visivo le mappe comuni ai controlli anziani mostrano le medesime aree evidenziate anche nel giovane, incluso l'ippocampo. Ippocampo era sempre visibile nelle mappe di gruppo MCI, anche se con una minore estensione rispetto ai controlli anziani, mentre era scomparso nelle mappe MA CDR 0,5 e CDR 1. La connettività della PCC mostra un comportamento non-lineare visto che si aumenta nei pazienti MCI mentre è appena percettibile nei pazienti con MA-CDR 1. Al contrario la connettività ACC/MPFC persiste in tutti i gruppi. Nei pazienti MA si è evidenziato un notevole contributo orbito-frontale.

BIBLIOGRAFIA

1. Aharon I, Etcoff N, Ariely D, Chabris CF, O'Connor E, Breiter HC. Beautiful faces have variable reward value: fMRI and behavioral evidence. *Neuron*. 2001 Nov 8;32(3):537-51.
2. Baker SC, Rogers RD, Owen AM, Frith CD, Dolan RJ, Frackowiak RS, Robbins TW. Neural systems engaged by planning: a PET study of the Tower of London task. *Neuropsychologia*. 1996 Jun;34(6):515-26.71
3. Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 May 29;360(1457):1001-13.
4. Beckmann CF, Smith SM. Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging*. 2004 Feb;23(2):137-52.
5. Binder JR, Frost JA, Hammeke TA, Bellgowan PS, Rao SM, Cox RW. Conceptual processing during the conscious resting state. A functional MRI study. *J Cogn Neurosci*. 1999 Jan;11(1):80-95.
6. Biswal BB, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med*. 1995; 34:537-541.
7. Bressler SL, Kelso JA. Cortical coordination dynamics and cognition. *Trends Cogn Sci*. 2001 Jan 1;5(1):26-36.
8. Cabeza R, Dolcos F, Graham R, Nyberg L. Similarities and differences in the neural correlates of episodic memory retrieval and working memory. *Neuroimage*. 2002 Jun;16(2):317-30.
9. Cordes D, Haughton V, Carew JD, Arfanakis K, Maravilla K. Hierarchical clustering to measure connectivity in fMRI resting-state data. *Magn Reson Imaging*. 2002 May;20(4):305-17.
10. Cordes D, Haughton VM, Arfanakis K, Carew JD, Turski PA, Moritz CH, Quigley MA, Meyerand ME. Frequencies contributing to functional connectivity in the cerebral cortex in "resting-state" data. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001 Aug;22(7):1326-33.
11. Cordes D, Haughton VM, Arfanakis K, Wendt GJ, Turski PA, Moritz CH, Quigley MA, Meyerand ME. Mapping functionally related regions of brain with functional connectivity MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000 Oct;21(9):1636-44.
12. Damasio AR, Grabowski TJ, Bechara A, Damasio H, Ponto LL, Parvizi J, Hichwa RD. Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nat Neurosci*. 2000 Oct;3(10):1049-56.
13. De Luca M, Beckmann CF, De Stefano N, Matthews PM, Smith SM. fMRI resting state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain. *Neuroimage*. 2005 Oct 27.
14. De Luca M, Smith S, De Stefano N, Federico A, Matthews PM. Blood oxygenation level dependent contrast resting state networks are relevant to functional activity in the neocortical sensorimotor system. *Exp Brain Res*. 2005 Dec;167(4):587-94.

15. Desgranges B, Baron JC, Eustache F. The functional neuroanatomy of episodic memory: the role of the frontal lobes, the hippocampal formation, and other areas. *Neuroimage*. 1998 Aug;8(2):198-213.
16. Fiset P, Paus T, Daloze T, Plourde G, Meuret P, Bonhomme V, Hajj-Ali N, Backman SB, Evans AC. Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study. *J Neurosci*. 1999 Jul 1;19(13):5506-13.
17. Fransson P. Spontaneous low-frequency BOLD signal fluctuations: an fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis. *Hum Brain Mapp*. 2005 Sep;26(1):15-29.
18. Friedman HR, Goldman-Rakic PS. Coactivation of prefrontal cortex and inferior parietal cortex in working memory tasks revealed by 2DG functional mapping in the rhesus monkey. *J Neurosci*. 1994 May;14(5 Pt 1):2775-88.
19. Fries P, Neuenschwander S, Engel AK, Goebel R, Singer W. Rapid feature selective neuronal synchronization through correlated latency shifting. *Nat Neurosci*. 2001 Feb;4(2):194-200.
20. Friston KJ. The disconnection hypothesis. *Schizophr Res*. 1998 Mar 10;30(2):115-25.
21. Fujii T, Okuda J, Tsukiura T, Ohtake H, Miura R, Fukatsu R, Suzuki K, Kawashima R, Itoh M, Fukuda H, Yamadori A. The role of the basal forebrain in episodic memory retrieval: a positron emission tomography study. *Neuroimage*. 2002 Mar;15(3):501-8.
22. Ghatan PH, Hsieh JC, Wirsén-Meurling A, Wredling R, Eriksson L, Stone-Elander S, Levander S, Ingvar M. Brain activation induced by the perceptual maze test: a PET study of cognitive performance. *Neuroimage*. 1995 Jun;2(2):112-24.
23. Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):253-8.
24. Greicius MD, Menon V. Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. *J Cogn Neurosci*. 2004 Nov;16(9):1484-92.
25. Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4637-42.
26. Gusnard DA, Akbudak E, Shulman GL, Raichle ME. Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: relation to a default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4259-64.
27. Gusnard DA, Raichle ME, Raichle ME. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):685-94.
28. Hampson M, Peterson BS, Skudlarski P, Gatenby JC, Gore JC. Detection of functional connectivity using temporal correlations in MR images. *Hum Brain Mapp*. 2002 Apr;15(4):247-62.
29. Hoffman RE, McGlashan TH. Parallel distributed processing and the emergence of schizophrenic symptoms. *Schizophr Bull*. 1993;19(1):119-40.
30. Jiang T, He Y, Zang Y, Weng X. Modulation of functional connectivity during the resting state and the motor task. *Hum Brain Mapp*. 2004 May;22(1):63-71.
31. Johnson SC, Baxter LC, Wilder LS, Pipe JG, Heiserman JE, Prigatano GP. Neural correlates of self-reflection. *Brain*. 2002 Aug;125(Pt 8):1808-14.

32. Jonides J, Schumacher EH, Smith EE, Koeppe RA, Awh E, Reuter-Lorenz PA, Marshuetz C, Willis CR. The role of parietal cortex in verbal working memory. *J Neurosci.* 1998 Jul 1;18(13):5026-34.
33. Kiviniemi V, Jauhiainen J, Tervonen O, Paakko E, Oikarinen J, Vainionpaa V, Rantala H, Biswal B. Slow vasomotor fluctuation in fMRI of anesthetized child brain. *Magn Reson Med.* 2000 Sep;44(3):373-8.
34. Koch MA, Norris DG, Hund-Georgiadis M. An investigation of functional and anatomical connectivity using magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2002 May;16(1):241-50.
35. Krueger G, Glover GH. Physiological noise in oxygenationsensitive magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 2001; 46:631–637.
36. Laufs H, Krakow K, Sterzer P, Eger E, Beyerle A, Salek-Haddadi A, Kleinschmidt A. Electroencephalographic signatures of attentional and cognitive default modes in spontaneous brain activity fluctuations at rest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):11053-8.
37. Laureys S, Goldman S, Phillips C, Van Bogaert P, Aerts J, Luxen A, Franck G, Maquet P. Impaired effective cortical connectivity in vegetative state: preliminary investigation using PET. *Neuroimage.* 1999 Apr;9(4):377-82.
38. Leopold DA, Murayama Y, Logothetis NK. Very slow activity fluctuations in monkey visual cortex: implications for functional brain imaging. *Cereb Cortex.* 2003 Apr;13(4):422-33.
39. Lowe MJ, Dzemidzic M, Lurito JT, Mathews VP, Phillips MD. Correlations in low-frequency BOLD fluctuations reflect cortico-cortical connections. *Neuroimage.* 2000 Nov;12(5):582-7.75
40. Lowe MJ, Mock BJ, Sorenson JA. Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations. *Neuroimage.* 1998 Feb;7(2):119-32.
41. Lowe MJ, Phillips MD, Lurito JT, Mattson D, Dzemidzic M, Mathews VP. Multiple sclerosis: low-frequency temporal blood oxygen level-dependent fluctuations indicate reduced functional connectivity initial results. *Radiology.* 2002 Jul;224(1):184-92.
42. Maddock RJ, Garrett AS, Buonocore MH. Remembering familiar people: the posterior cingulate cortex and autobiographical memory retrieval. *Neuroscience.* 2001;104(3):667-76.
43. Maddock RJ. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci.* 1999 Jul;22(7):310-6.
44. Maguire EA, Mummery CJ. Differential modulation of a common memory retrieval network revealed by positron emission tomography. *Hippocampus.* 1999;9(1):54-61.
45. Marx E, Deutschlander A, Stephan T, Dieterich M, Wiesmann M, Brandt T. Eyes open and eyes closed as rest conditions: impact on brain activation patterns. *Neuroimage.* 2004 Apr;21(4):1818-24.
46. Mayberg HS. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1997 Summer;9(3):471-81.
47. Mazoyer B, Zago L, Mellet E, Bricogne S, Etard O, Houde O, Crivello F, Joliot M, Petit L, Tzourio-Mazoyer N. Cortical networks for working memory and executive functions sustain the conscious resting state in man. *Brain Res Bull.* 2001 Feb;54(3):287-98.
48. McGuire PK, Paulesu E, Frackowiak RS, Frith CD. Brain activity during stimulus independent thought. *Neuroreport.* 1996 Sep 2;7(13):2095-9.

49. McKiernan KA, Kaufman JN, Kucera-Thompson J, Binder JR. A parametric manipulation of factors affecting task-induced deactivation in functional neuroimaging. *J Cogn Neurosci*. 2003 Apr 1;15(3):394-408.76
50. Mitra PP, Ogawa S, Hu X, Ugurbil K. The nature of spatiotemporal changes in cerebral hemodynamics as manifested in functional magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 1997 Apr;37(4):511-8.
51. Petrides M. The role of the mid-dorsolateral prefrontal cortex in working memory. *Exp Brain Res*. 2000 Jul;133(1):44-54.
52. Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):676-82.
53. Saykin AJ, Johnson SC, Flashman LA, McAllister TW, Sparling M, Darcey TM, Moritz CH, Guerin SJ, Weaver J, Mamourian A. Functional differentiation of medial temporal and frontal regions involved in processing novel and familiar words: an fMRI study. *Brain*. 1999 Oct;122 (Pt 10):1963-71.
54. Shulman GL, Fiez JA, Corbetta M, Buckner RL, Miezin FM, Raichle ME, Petersen SE. Common blood flow changes across visual tasks: II. Decreases in cerebral cortex. *J Cogn Neurosci*. 1997; 9:648-663.
55. Simpson JR Jr, Drevets WC, Snyder AZ, Gusnard DA, Raichle ME. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):688-93.
56. Simpson JR Jr, Snyder AZ, Gusnard DA, Raichle ME. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: I. During cognitive task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):683-7.
57. Thirion B, Dodel S, Poline JB. Detection of signal synchronizations in resting-state fMRI datasets. *Neuroimage*. 2006 Jan 1;29(1):321-7.
58. Ungerleider LG, Haxby JV. 'What' and 'where' in the human brain. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Apr;4(2):157-65.
59. Van de Ven VG, Formisano E, Prvulovic D, Roeder CH, Linden DE. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. *Hum Brain Mapp*. 2004 Jul;22(3):165-78.77
60. Warburton E, Wise RJ, Price CJ, Weiller C, Hadar U, Ramsay S, Frackowiak RS. Noun and verb retrieval by normal subjects. Studies with PET. *Brain*. 1996 Feb;119 (Pt 1):159-79.
61. Wicker B, Ruby P, Royet JP, Fonlupt P. A relation between rest and the self in the brain? *Brain Res Brain Res Rev*. 2003 Oct;43(2):224-30.
62. Wise RG, Ide K, Poulin MJ, Tracey I. Resting fluctuations in arterial carbon dioxide induce significant low frequency variations in BOLD signal. *Neuroimage*. 2004 Apr;21(4):1652-64.
63. Xiong J, Parsons LM, Gao JH, Fox PT. Interregional connectivity to primary motor cortex revealed using MRI resting state images. *Hum Brain Mapp*. 1999;8(2-3):151-6.
64. R.C.Petersen. Mild Cognitive Impairment: Current Research and Clinical Implications. *Seminars in Neurology* (2007), vol 27, n1, pp 22-31.
65. M.D.Grecius, B.Krasnow, A.L.Reiss, V.Menon. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol 100 (2003): 253-258.
66. M.D.Grecius, V.Menon. Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. *J.Cognit. Neurosci*. Vol 16 (2004): 1484-1492.

67. M.D.Grecius, G.Srivastava, A.L.Reiss, V.Menon. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol 101 (2004): 4637-4642.
68. Levey, J.lah, F.Goldstein, K.Steenland, D.Bliwise. Mild Cognitive impairment: an opportunity to identify patients at high risk for progression to Alzheimer Disease. *Clinical Therapeutics*, vol 28, n 6 (2006).
69. P.Mecocci, E.Mariani, V.Cornacciola, M.C.Polidori. Antioxidant for the treatment of mild cognitive impairment: *Neurol. Res.* Vol 26 (2004): 598-602.
70. M.Sano, C.Ernesto, R.G.Thomas. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer Disease. *N. Engl. J Med*, vol 336 (1997): 1216-1222.
71. D.S.Knopman. Current treatment of mild cognitive impairment and Alzheimer's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol 6, n 5 (2006 sept): 365-71.
72. L.C.Baxter, D.L.Sparks, S.C. Johnson, B.Lenoski, J.E.Lopez, D.J.Connor, M.N.Sabbaqh. Relationship of cognitive measures and gray and white matter in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, vol 9, n 3 (2006 Aug): 253-260.
73. AJ.Saykin, HA Wishart, LA Rabin, RB Santulli, LA Flashman, JD West, TL McHugh, AC Maumurian. Older adults with cognitive complaints show brain atrophy similar to that of amnesic MCI. *Neurology*, vol 67, n 5 (2006 Sept): 834-842.
74. M.Bozzali, M.Filippi, G.Mangani, M.Cercignani, M.Franceschi, A.Falini et al. The contribution of voxel based morphometry in staging patients with mild cognitive impairment. *Neurology*, vol 67, n 3 (2006 Aug): 453-460.
75. S.Xie, X.J.Xiao, G.L.Gong, Y.F.Zang, Y.H. Wang, H.K.Wu , X.X.Jiang. Voxel-based detection of white matter abnormalities in mild Alzheimer Disease. *Neurology*, vol 66, n 12 (2006): 1845-9.
76. S.J.Teipel, W.H.Flatz, H.Heinsen, A.L.Bokde, S.O.Schoenberg, S.Stockel, O.Dietrich, M.F.Reiser, H.J.Moller, H.Hampel. Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. *Brain*, vol 128 (2005 Nov): 2626-2644.
77. K.Ischii, T.Kawachi, H.Sasaki, A.K.Kono, T.Fukuda, Y.Kojima, E.Mori. Voxel-based morphometric comparison between early- and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of z score images. *AJNR*, vol 26, n 2 (2005 Feb): 333-340.
78. J.R.Binder, J.A.Frost, T.A.Hammeke, P.S.Bellgowan, S.M.Rao, R.W.Cox. Conceptual processing during the conscious resting state. A functional MRI study. *J.Cogn.Neurosci.*, vol 11, n 1 (1999): 80-95.
79. F.Esposito, A.Bertolino, T.Scarabino, V.Latorre, G.Biasi, T.Popolizio, G.Tedeschi, S.Cirillo, R.Goebel, F.Di Salle. Independent component model of the default-mode brain function: Assessing the impact of active thinking. *Brain Research Bulletin*, vol 7039 (2006): 1-7.
80. Hamalainen, M.Pihlajamaki, H.Tanila, T.Hanninen, E.Niskanen, S.Tervo, P.A.Karjalainen, R.L.Vanninen, H.Soininen. Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* (2006).
81. J.Barnes, J.L.Whitwell, C.Frost, K.A.Josephs, M.Rossor, N.C.Fox. Measurements of the amygdala and hippocampus in pathologically confirmed Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol*, vol 63, n 10 (2006): 1434-1439.

82. J.Barnes, A.K.Godbolt, C.Frost, R.G.Boyes, B.F.Jones, R.I.Scahill, M.Rossor, N.C.Fox. Atrophy rates of the cingulate gyrus and hippocampus in AD and FTLD: *Neurobiol Aging* (2006).
83. L.Wang, Y.Zang, Y.He, M.Liang, X.Zhang, L.Tian, T.Wu, T.Jiang, K.Li. Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: evidence from resting state fMRI. *Neuroimage*, vol 31, n 2 (2006 Jun): 496-504.
84. P.Fransson. How default is the default mode of brain function? Further evidence from intrinsic BOLD signal fluctuation. *Neuropsychologia* (2006): In Press.
85. M.D.Fox, A.Z.Snyder, J.L.Vincent, M.Corbetta, D.C.Van Essen, M.E.Raichle. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. *PNAS* vol 102, n 27 (2005 Jul): 9673-9678.
86. M. De Luca, C.F.Beckmann, N.De Stefano, P.M.Matthews, S.M.Smith. fMRI resting state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain. *Neuroimage*, vol 29 (2006): 1359-1367.
87. R.Salvador, J.Suckling, M.R.Coleman, J.D.Pickard, D.Menon, E.Bullmore. Neurophysiological architecture of Functional Magnetic Resonance imaging of Human Brain. *Cerebral Cortex*, vol 15 (2005 Sept): 1332-1342.
88. K.L.Weiss, H.Pan, J.Storrs, W. Strub, J.L.Weiss, L.Jia, O.P.Eldevik. Clinical brain MR Imaging in Talaraich space: technologist and computer-driven methods. *AJNR*, vol 24 (2003, May): 922-929.
89. S.Haykin, Z.Chen. The cocktail party problem. *Neural Comput*, vol 17, n 9 (2005 Sept): 1875-1902.
90. B.B.Biswal, J.L.Ulmer. Blind source separation of multiple signal sources of fMRI data sets using independent component analysis. *J Comput Assist Tomogr*, vol 23, n 2 (1999): 265-271.
91. F.Esposito, T.Scarabino, A.Hyvarinen, J.Hymberg, E.Formisano, S.Comani, G.Tedeschi, R.Goebel, E.Seifritz, F. Di Salle. Independent component analysis of fMRI group studies by self-organizing clustering. *Neuroimage*, vol 25, n 1 (2005 Mar): 193-205.
92. K.A.Celone, V.D.Clhoun, B.C.Dickerson, A.Atri, E.F.Chua, S.L.Miller, K.DePeau, D.M.Rentz, D.J.Selkoe, D.Blackler, M.S.Albert, R.A.Sperling. Alterations in memory networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: An Independent Component Analysis. *The Journal of Neuroscience*, vol 26, n 4 (2006, Oct): 10222-10231.
93. F.Z.Yetkin, R.N.Rosenberg, M.F.Weiner, P.D.Purdy, C.M.Cullum. FMRI of working memory in patients with mild cognitive impairment and probable Alzheimer's Disease. *Eur Radiol*, vol 16 (2006): 193-206.
94. L.Wang et al. Changes in Hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's Disease: evidence from resting state fMRI. *Neuroimage*, vol 31, n 2 (2006): 496-504.
95. Golby, G.Silverberg, E.Race, S.Gabrieli, J.O'Shea, K.Knierim, G.Stebbins, J.Gabrieli. Memory encoding in Alzheimer's disease: an fMRI study of explicit and implicit memory. *Brain*, vol 128 (2005): 773-787.
96. H.Matsuda, N.Kitayama, T.Ohnishi, T.Asada, S.Nakano, S.Sakamoto, E.Imabayashi, A.K.Katoh. Longitudinal evaluation of both morphologic and functional changes in the same individuals with Alzheimer's Disease. *The Journal of Nuclear Medicine*, vol 43, n 3 (2002).

97. Y.He, L.Wang, Y.Zang, L.Tian, X.Zhang, K.Li, T.Jiang. Regional coherence changes in the early stages of Alzheimer's disease: A combined structural and resting-state functional MRI study. *Neuroimage*, vol 35 (2007): 488-500.
98. R.Scheeringa, M.C.M.Bastiaansen, K.M.Petersson, R.Oostenveld, D.G.Norris, P.Hagoort. Frontal theta EEG activity correlates negatively with the default mode network in resting state. *International Journal of Psychophysiology* (2007).
99. S.A.Rombouts, F.Barkhof, R.Goekoop, C.J.Stam, P.Scheltens. Altered resting state network in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease: an fMRI study. *Human Brain Mapping*, vol 26 (4): 231-239.
100. M.J.McKeown, L.K.Hansen, T.J.Sejnowski. Independent component analysis of functional MRI: what is signal and what is noise?. *Current Opinion in Neurobiology* (2003), 13: 620-629.
101. J.R.Binder. Semantic processing during rest. *Functional MRI*, Springer (1999): pp413-415.
102. Y.Zhou, M.Liang; L.Tian, K.Wang, Y.Hao, H.Liu, Z.Liu, T.Jiang. Functional disintegration in paranoid schizophrenia using resting-state fMRI. *Schizophr Res*, Epub Jul 2007.
103. A.G.Garrity, G.D.Pearlson, K.McKiernan, D.Lloyd, K.A.Kiehl, V.D.Calhoun. Aberrant "Default Mode" Functional Connectivity in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* (2007), vol 164 (3): pp 450-457.
104. ZY.F.Zang, Y.He, C.Z.Zhu, Q.J.Cao, M.Q.Sui, M.Liang, L.X.Tian, T.Z.Jiang, Y.F.Wang. Altered baseline brain activity in children with ADHD revealed by resting-state functional MRI. *Brain and Development* (2007), vol 29: pp 83-91.
105. X.H.Zhao, P.J.Wang, C.B.Li, Z.H.Hu, Q.Xi, W.Y.Wu, X.W.Tang. Altered default mode network activity in patient with anxiety disorders: an fMRI study. *Eur J Radiol* (2007), vol 63 (3): pp373-378.
106. A.L.W.Bokde, P.Lopez-Bayo, T.Meindl, S.Pechler, C.Born, F.Faltraco, S.J.Teipel, H.J.Moller, H.Hampel. Functional connectivity of the fusiform gyrus during a face-matching task in subjects with mild cognitive impairment. *Brain* (2006),129: pp 1113-1124.
107. FZ Yetkin, R.N.Rosenberg, M.F.Weiner, P.D.Purdy, C.M.Cullum. FMRI of working memory in patients with mild cognitive impairment and probable Alzheimer's Disease. *Eur Radiol* (Jan 2006), vol 16 (1): pp 193-206.
108. M.M.Machulda, H.A.Ward, B.Borowski, J.L.Gunter, R.H.Cha, P.C.O'Brien, R.C.Petersen, B.F.Boeve, D.Knopman, D.F.Tang-Wai, R.J.Ivnik, G.E.Tangalos, C.R.Jack. Comparison of memory fMRI response among normal, MCI and Alzheimer's patients. *Neurology* (2003), vol 61: pp 500-506.
109. B.C.Dickerson, D.H.Salat, D.N.greve, E.F.Chua, E.Rand-Giovannetti, D.M.Rentz, L.Bertram, K.Mullin, R.E.Tanzi, D.Blackler, M.S.Albert, R.A.Sperling. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology* (Aug 2005) vol 65(3): pp 404-411.
110. H.Laufits, K.Krakow, P.Sterzer, E.Eger, A.Beyerle, A.Salek-Haddadi, A.Kleinschmidt. Electroencephalographic signatures of attentional and cognitive default modes in spontaneous brain activity fluctuations at rest. *PNAS* (Sept 2003), vol 100 (19): pp 11053-11058.
111. S.I.Goncalves, J.C.De Munck, P.J.W.Pouwels, R.Schoonhoven, J.P.A.Kuijjer, N.M.Maurits, J.M.Hoogduin, E.J.W.Van Someren, R.M.Heethaar, F.H.Lopes da

- Silva. Correlating the alpha rhythm to BOLD using simultaneous EEG/fMRI: Inter-subject variability. *Neuroimage* (2006), vol30: pp 203-213.
112. R.Scheeringa, M.C.M.Bastiaansen, K.M.Petersson, R.Oostenveld, D.G.Norris, P.Hagoort. Frontal theta EEG activity correlates negatively with the default mode network in resting state. *International Journal of Psychophysiology* (2007), in Press.
 113. K.A.McKiernan, B.R.D'Angelo, J.N.Kaufman, J.R.Binder. Interrupting the "stream of consciousness": An fMRI investigation. *Neuroimage* (2005).
 114. S.G.Horowitz, M.Fukunaga, J.A.De Zwart, P.van Gelderen, S.C.Fulton, T.J.Balkin, J.H.Duyn. Low frequency BOLD fluctuations during resting wakefulness and light sleep. A simultaneous EEG-fMRI study. *Human Brain Mapping* (2007)
 115. Mary C. Tierney, PhD, Rory H. Fisher, MB, Anthony J. Lewis, MD, Maria L. Zoritto, MD, W. Gary Snow, PhD, David W. Reid, PhD and Paula Nieuwstraten, MD. The NINCDS-ARDA Work Group criteria for the clinical diagnosis of probable Alzheimer's Disease. A clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* 1988;38:359.
 116. McKhann G, Drachman DA, Folstein MF, Katzman R, Price DL, Stadlan E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-944.
 117. L. Lopez, MD, A. A. Swihart, PhD, J. T. Becker, PhD, O. M. Reinmuth, MD, C. F. Reynolds, III, MD, D. L. Rezek, MD and F. L. Daly, III, MD. Reliability of NINCDS-ARDA clinical criteria for the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurology* (1990), vol 40: 1517.
 118. Bruno Dubois*, Howard H Feldman*, Claudia Jacova, Steven T DeKosky, Pascale Barberger-Gateau, Jeffrey Cummings, André Delacourte, Douglas Galasko, Serge Gauthier, Gregory Jicha, Kenichi Meguro, John O'Brien, Florence Pasquier, Philippe Robert, Martin Rossor, Steven Salloway, Yaakov Stern, Pieter J Visser, Philip Scheltens. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurology* 2007, vol 6: 734-46.
 119. C DeCarli. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology and treatment. *Lancet Neurol*, 2003, vol 2(1): 15-21.
 120. Anja Buse, Jeannette Bischof, Steffi G.Riedel-Heller, Matthias C.Angermeyer. Mild cognitive impairment: prevalence and incidence according to different diagnostic criteria. *British Journal of Psychiatry* (2003), vol 182: 449-454
 121. Karen Ritchie, Jacques Touchon. Mild cognitive impairment: conceptual basis and current nosological status. *The Lancet*, vol 355 (2000 jan): 2000-2225.
 122. J. Bischof, A. Busse, M. C. Angermeyer. Mild cognitive impairment I – a review of prevalence, incidence and outcome according to current approaches. *Acta Psychiatr Scand* 2002, vol 106: 403-414.
 123. Koch MA, Norris DG, Hund-Georgiadis M. An investigation of functional and anatomical connectivity using magnetic resonance imaging. *Neuroimage* (2002), vol 16: 241-250.
 124. Cordes D, Haughton V, Carew JD, Arfanakis K, Maravilla K. Hierarchical clustering to measure connectivity in fMRI resting-state data. *Magn Reson Imaging* (2002), vol 20 (4): 305-317.

125. Lowe MJ, Mock BJ, Sorenson JA. Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations. *Neuroimage* (1998), vol 7 (2): 119-232.
126. Thirion B, Dodel S, Poline JB. Detection of signal synchronizations in resting-state fMRI datasets. *Neuroimage* (2006), vol 29 (1): 321-327.
127. Van de Ven VG, Formisano E, Prvulovic D, Roeder CH, Linden DE. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. *Hum Brain Mapp* (2004) vol 22(3):165-78.
128. Gusnard DA, Raichle ME, Raichle ME. . Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):685-94.
129. Johnson SC, Baxter LC, Wilder LS, Pipe JG, Heiserman JE, Prigatano GP. Neural correlates of self-reflection. *Brain*. 2002 Aug;125(Pt 8):1808-14.
130. Maguire EA, Mummery CJ. Differential modulation of a common memory retrieval network revealed by positron emission tomography. *Hippocampus*. 1999;9(1):54-61.
131. *Hum Brain Mapp*. 2007 Feb 1 :Estimating the number of independent components for functional magnetic resonance imaging data. Li YO, Adali T, Calhoun VD
132. *Hum Brain Mapp*. 2007 Jun 27: Ranking and averaging independent component analysis by reproducibility (RAICAR). Yang Z, Laconte S, Weng X, Hu X.
133. *Neuroimage*. 2004 Jul;22(3):1214-22. Validating the independent components of neuroimaging time series via clustering and visualization. Himberg J, Hyvärinen A, Esposito F.
134. *IEEE Trans Med Imaging*. 2004 Feb;23(2):137-52. Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. Beckmann CF, Smith SM.