

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

SCUOLA DI DOTTORATO IN NEUROSCIENZE DI BASE ED APPLICATE
Direttore Prof. R. Corradetti

DOTTORATO IN NEUROSCIENZE XXII CICLO
Coordinatore Prof. L. Massacesi

Settore scientifico-disciplinare MED/26 Neurologia

**Correlati Neurali del Deficit Mnesico:
Studio VBM e DTI in soggetti affetti da Disturbo Soggettivo di
Memoria, Mild Cognitive Impairment e Malattia di Alzheimer**

**Tesi di Dottorato di
Valentina Bessi**

**Tutor: Prof. Sandro Sorbi
U.O. Neurologia I
Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche
Università di Firenze**

Anno Accademico 2009 / 2010

INDICE

INTRODUZIONE	1
Disturbo Soggettivo di Memoria, Mild Cognitive Impairment, Malattia di Alzheimer: un <i>continuum</i> del deficit mnesico?	1
L'atrofia della sostanza grigia nel declino cognitivo: metodiche di analisi e profilo delle anomalie	5
<i>La metodica delle "Region of Interest" (ROI)</i>	6
<i>La Voxel-Based Morphometry (VBM)</i>	7
<i>Profilo delle anomalie VBM in AD e MCI</i>	8
<i>Studi di correlazione VBM-misure neuropsicologiche</i>	9
La degenerazione della sostanza bianca nel declino cognitivo: metodiche di analisi e profilo delle anomalie.....	10
<i>Il diffusion tensor imaging (DTI)</i>	13
<i>Tract-based spatial statistics (TBSS)</i>	14
<i>Profilo delle anomalie DTI in AD e MCI</i>	15
<i>Studi di correlazione DTI-misure neuropsicologiche</i>	16
OBIETTIVI	17
SOGGETTI E METODI	18
Soggetti.....	18
La valutazione neuropsicologica.....	18
Acquisizione ed analisi delle immagini RM.....	19
<i>Analisi delle immagini</i>	20
Analisi statistica.....	22

RISULTATI	24
Caratteristiche clinico-demografiche della popolazione.....	24
Valutazione RM soggettiva.....	24
VBM.....	25
TBSS.....	26
TABELLE E IMMAGINI	
DISCUSSIONE	27
CONCLUSIONI	35
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUZIONE

Disturbo Soggettivo di Memoria, Mild Cognitive Impairment, Malattia di Alzheimer: un *continuum* del deficit mnesico?

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta la più frequente causa (50-60% dei casi) di deterioramento cognitivo nei paesi occidentali (Fratiglioni et al., 1991; Lobo A et al., 2000). Presenta un decorso caratterizzato da un prevalente ed iniziale deficit di memoria episodica seguito dal progressivo, sequenziale impoverimento delle funzioni attentive ed esecutive, della memoria semantica, del linguaggio, dell'orientamento, delle abilità visuo-spaziali e della prassia (Perry et al., 2000). I markers istopatologici distintivi della malattia sono le placche senili, i grovigli neurofibrillari e l'angiopatia amiloide. A prescindere dalla cascata di eventi patogenetici antecedenti - accumulo della beta-amiloide e/o alterazioni del citoscheletro neuronale - la via finale comune sul piano strutturale è rappresentata dalla crescente estensione della neurodegenerazione. Alcuni studi istopatologici, sulla base della distribuzione topografica dei NFT in pazienti a diversi livelli di gravità del deterioramento mentale, hanno ipotizzato una progressione per stadi, in cui alcune regioni verrebbero colpite prima di altre: all'interessamento precoce ed importante della regione transentorinale (stadi I-II), e successivamente (stadi III-IV) delle strutture limbiche (corteccia entorinale, subiculum e complesso ippocampale CA1), seguirebbe il coinvolgimento della neocortex temporale e delle aree associative parietali e frontali (stadi V-VI) (Hyman et al., 1990; Braak & Braak, 1991). Al contrario la corteccia motoria primaria, la corteccia sensitiva e quella visiva sarebbero risparmiate anche negli stadi più avanzati della malattia. Questo pattern di progressione della patologia, pur non essendo condiviso unanimamente (Galton et al., 2000), ha ricevuto particolare consenso, in quanto ben riflette le diverse fasi di

coinvolgimento cognitivo. Un ruolo centrale viene così attribuito ai disturbi dell'elaborazione mnestica dell'informazione, ritenuti un tratto essenziale e precoce del quadro neuropsicologico dell'AD; pertanto, l'interessamento negli stadi precoci della malattia delle strutture temporali mesiali, incluso il complesso ippocampale, area cruciale nell'acquisizione di nuovi ricordi (Squire, 1992), bene si attaglia all'iniziale compromissione della memoria episodica.

La messa a punto di criteri internazionalmente accettati per la diagnosi clinica di demenza -ICD-10, 1992; DSM-IV, 1994- ed in particolare di quelli formulati dal *Work Group on Dementia* per la malattia di Alzheimer (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al., 1984) ha consentito il raggiungimento di elevati livelli di sensibilità e specificità rispetto alla diagnosi istopatologica che rimane l'unica di certezza (Mirra et al., 1991). Negli ultimi anni, per la scoperta di presidi terapeutici *disease-modifying*, si è assistito ad una progressiva anticipazione della diagnosi e si è sentita la necessità di proporre nuovi criteri diagnostici (Dubois et al., 2007), basati sul possibile utilizzo di alcuni markers biologici. Si è quindi posta l'attenzione, tra gli altri, alle modificazioni dei volumi di regioni cerebrali specifiche come il lobo temporale mesiale e, sul piano clinico-neuropsicologico, al deficit della memoria episodica e alle fasi precliniche di malattia, quali, prima fra tutte, il Mild Cognitive Impairment (MCI).

L'MCI è definito come un declino cognitivo maggiore rispetto a quello che ci si può attendere in un individuo di pari età e grado di scolarità, ma con un deficit funzionale insufficiente per porre la diagnosi di demenza (Petersen et al., 1999). Questa condizione sottende un'ampia eterogeneità di quadri clinici pre-demenza con diversi sottotipi. Quello più noto e meglio definito sul piano diagnostico è l'MCI amnesico, che si presenta clinicamente con deficit mnesici come caratteristica principale, sebbene possano essere coinvolti altri domini cognitivi, configurando in tal caso la forma di MCI "amnesico-multidomain" (Petersen et al., 2001). L'MCI amnesico è la condizione in cui

è stata dimostrata il più elevato tasso di conversione ad AD (Petersen et al., 2001), mentre i quadri di MCI non amnesico possono progredire verso altre forme di demenza (Knopman et al., 2003). Gli studi longitudinali di popolazione hanno mostrato che non tutti i soggetti affetti da MCI sviluppano AD ed il tasso di conversione annuale varia dal 10 al 15%, mentre la reversibilità si verifica in circa il 40% degli individui (Modrego et al., 2005; Ganguli et al., 2004). L'utilizzo di biomarkers capaci di identificare i pazienti con MCI che sono più a rischio per lo sviluppo di demenza potrebbe perciò essere utile, specialmente quando siano disponibili interventi di prevenzione. L'ipotesi che l'MCI costituisca uno stadio di transizione tra normalità e progressione ad AD sembra confermata da studi di *neuroimaging* che hanno indagato le strutture meso-temporali, in particolare l'ippocampo, il giro para ippocampale, la corteccia entorinale e peririnale, tutte fondamentali per le attività mnesiche. Uno studio longitudinale effettuato con Risonanza Magnetica (RM) su un gruppo di soggetti con declino cognitivo lieve ha permesso di evidenziare come una maggior atrofia dell'ippocampo si associ ad un aumentato rischio di evoluzione a demenza (Jack et al., 1999). L'osservazione successiva che nei soggetti MCI sia presente una riduzione del volume della corteccia entorinale maggiore rispetto a quella ippocampale ha fatto ritenere che possa essere la corteccia entorinale l'area cerebrale colpita più precocemente dall'atrofia, e la sua riduzione di volume un marker di MCI (Pennanen et al., 2004).

L'identificazione del "*brain at risk*" prima dell'MCI è quindi un importante obiettivo per la possibilità di utilizzare terapie "*disease-modifying*", associate a trattamenti mirati alla prevenzione della comorbidità e al potenziamento della riserva cerebrale, prima della comparsa della sintomatologia. Dal momento che il deficit di memoria è il sintomo più precoce e rilevante nell'AD e l'unico nell'MCI, condizione che a sua volta può preludere all'AD, è d'interesse stabilire la relazione tra queste entità nosologiche e il Disturbo Soggettivo di Memoria (DSM), una categoria difficilmente inquadrabile il cui valore

clinico è ancora molto dibattuto (Abdulrab et al., 2008). Questo termine indica una condizione in cui il soggetto “riporta delle lamentele riguardo l’efficienza della propria memoria. Questo deficit non è in relazione né con l’età né con la demenza e non ha ripercussioni in altri aspetti della vita” (Guarach et al., 2004) e, secondo le più recenti linee guida (Reid et al., 2006), non è accompagnato da una compromissione rilevabile da test neuropsicologici. Sia nel Disturbo Soggettivo di Memoria (DSM) che nell’MCI non ci sono limitazioni nelle attività della vita quotidiana, ma, a differenza di quest’ultimo, nel DSM il deficit mnesico è avvertito esclusivamente dal soggetto e non da chi vive a stretto contatto con esso. Considerando solo gli studi di popolazione la prevalenza del DSM varia dal 25% a più del 50% (Jonker et al., 2000). Schofield e coll. in uno studio risalente al 1997 evidenziavano una forte relazione tra il DSM e la conversione a demenza, ma solo nel sottogruppo che presentava già una compromissione cognitiva oggettivabile alla prima valutazione. Ad una attenta revisione della letteratura (Jonker et al., 2000) emerge che esiste una relazione più forte tra DSM e disturbi depressivi che tra DSM e declino cognitivo¹. Alcuni studi longitudinali indicano che il disturbo soggettivo possa predire il declino cognitivo al follow up o la conversione a demenza (Dik et al., 2001), in particolare nei portatori di allele ε4 dell’Apolipoproteina E (APOE)², e altri ritengono al contrario che questa relazione manchi di validità (Schofield et al., 1997). Dai risultati ad oggi presenti in letteratura possiamo affermare che il DSM sembra correlare con un futuro declino cognitivo o demenza solo in quei soggetti che presentino al basale qualche alterazione rilevabile ai test neuropsicologici. D’altra parte sono state

¹ Questo però si evidenzia solo in studi in cui venivano arruolate esclusivamente persone che si erano recate spontaneamente dallo specialista lamentando il disturbo di memoria (*self-referrals*) e non in quelli condotti su una ampia popolazione di anziani residenti in comunità. Analogamente Elfgren e coll. (2003) hanno suggerito come aver vissuto eventi stressanti possa interferire con l’integrità dei processi mnesici e predisporre al DSM.

² L’APOE è una proteina coinvolta nel trasporto del colesterolo, dei fosfolipidi e degli ormoni steroidei, ha un ruolo nella modulazione della crescita neuritica, nella rigenerazione neuronale, nella plasticità e nel rimodellamento sinaptico. Delle tre isoforme – E2, E3, E4 - la APOE-E4 rappresenta il maggior fattore di rischio genetico per lo sviluppo di AD tardivo, sia sporadico che familiare.

individuate, nei soggetti affetti da DSM dimensioni dell'ippocampo (van der Flier et al., 2004) e della corteccia entorinale ridotte rispetto a quelle previste in base all'età (Jessen et al., 2006) e studi post-mortem hanno evidenziato un quadro anatomopatologico correlato a quello della malattia di Alzheimer in soggetti non dementi, ma affetti da un lieve disturbo cognitivo non rilevabile ai comuni test neuropsicologici (Bennett et al., 2006).

Da quanto detto si evince che, negli ultimi anni, si è sentita la necessità di una diagnosi sia clinica che strumentale sempre più precisa e precoce, per poter, dove possibile, intraprendere una terapia farmacologica e/o riabilitativa. Anche alla luce della proposta di nuovi criteri diagnostici (Dubois et al., 2007), seppur non unanimemente approvati, diventa quindi di grande interesse l'identificazione di uno strumento diagnostico sufficientemente sensibile alle più precoci modificazioni cognitive o biologiche rilevate in AD, che allo stesso tempo sia in grado di differenziare tra AD precoce, MCI, DSM ed invecchiamento fisiologico e che possa contribuire a far luce sugli aspetti ancora non chiariti del processo neurodegenerativo che conduce alla demenza.

L'atrofia della sostanza grigia nel declino cognitivo: metodiche di analisi e profilo delle anomalie

Le moderne tecniche di RM sono adesso ampiamente usate per indagare i deficit di volume regionale ed altre anomalie strutturali associate alla vulnerabilità allo sviluppo di AD e alla sua progressione (Teipel et al., 2008).

Sia negli studi morfometrici che in quelli funzionali in AD, gli indici regionali sono normalmente ottenuti in gruppi di soggetti affetti e confrontati con quelli di gruppi di controllo di soggetti sani, appaiati per caratteristiche demografiche. I due approcci più utilizzati per effettuare queste analisi quantitative e per fare confronti tra gruppi sono quello delle "Region of Interest" (ROI) ed le metodiche di analisi *voxel per voxel*.

La metodica delle “Region of Interest” (ROI)

L’approccio delle ROI consiste nell’analisi di strutture cerebrali precedentemente selezionate, nella maggior parte dei casi manualmente, in modo da ottenere informazioni quantitative su tali regioni. Perciò, tale metodica non permette la misura di volumi regionali cerebrali in una maniera “*whole-brain*”. Negli studi morfometrici in AD l’approccio basato sulle ROI è stato impiegato per ottenere indici volumetrici nella maggior parte nell’ippocampo o in altre selezionate strutture temporo-mesiali (Callen et al., 2001, Jack et al., 2004, Wang et al., 2006; Aposoltova et al., 2006). Le misure manuali sono effettuate in alcune fette sottili lungo l’estensione di strutture di interesse e perciò comportano un intenso lavoro in termini di tempo e sono soggette ad errori da parte dell’osservatore. Recentemente sono stati messi a punto metodiche automatizzate per misurare i volumi ippocampali in una maniera più veloce, attraverso algoritmi parametrici (Wang et al., 2006). Tuttavia tali strumenti richiedono ulteriori valutazioni; inoltre, i confini anatomici utilizzati variano nei differenti studi ROI manuali ed automatizzati (Callen et al., 2001, Jack et al., 2004, Wang et al., 2006; Aposoltova et al., 2006), limitando così i confronti tra lavori diversi e la conduzione di metanalisi sui risultati ottenuti. Come alternativa alle misure basate sulle ROI, molti studi di *neuroimaging* nelle ultime due decadi hanno utilizzato metodi automatizzati che permettono un confronto di indici regionali all’interno di tutto l’encefalo in una maniera libera da ipotesi, senza la necessità di una selezione a priori delle regioni anatomiche e con perfetta riproducibilità. Questo stesso approccio è stato in origine utilizzato per i lavori PET del metabolismo regionale di glucosio o del flusso regionale basato sullo studio delle mappe statistiche parametriche (SPM) (Friston et al., 1991); più recentemente lo stesso concetto è stato applicato alle misure morfometriche di volume regionale di sequenze RM.

La Voxel-Based Morphometry (VBM)

L'applicazione di un approccio *voxel-based* per il confronto di volumi regionali di sostanza grigia tra differenti gruppi di soggetti studiati mediante RM è denominato Voxel-Based Morphometry (VBM).

La VBM nasce dall'esigenza di confrontare gruppi di soggetti omogenei eliminando le differenze interindividuali. Utilizzando immagini RM ad alta risoluzione spaziale e di contrasto, la VBM permette di ordinare queste stesse immagini in uno spazio stereotassico comune eliminando dunque le differenze di posizione e volume individuali, operando in altri termini una "normalizzazione" spaziale. È una metodica completamente automatica che consente di analizzare *voxel per voxel* l'intero encefalo al fine di evidenziare aree di atrofia loco-regionale senza necessità di ipotesi a priori.

L'analisi VBM prevede a partire da immagini T1 pesate una serie di passaggi. Per prima cosa occorre creare un *template*, ovvero una immagine di riferimento specifica (spazio standard di Talairach), utilizzando software appositi con *template* preconfezionati o creati *de novo* a seconda delle esigenze; le immagini originali vengono poi normalizzate al *template* e sottoposte a segmentazione che consiste nell'individuare e selezionare la sostanza bianca, quella grigia e il liquido cerebrospinale al fine di poterli analizzare separatamente. Si effettua quindi il cosiddetto *smoothing* spaziale per mediare i valori dei vari *voxel* in un *range* determinato così da aumentare il segnale delle immagini e riportare i dati da analizzare in una distribuzione gaussiana. Per riportare le varie misure ottenute in volume assoluto ogni singolo *voxel* viene moltiplicato per una costante e questo procedimento prende il nome di modulazione. Infine si procede con l'analisi statistica effettuata *voxel per voxel*. Vengono a definirsi quindi dei *cluster* (somma di più *voxel*) che individuano una porzione di volume analizzato diversa (ad esempio una riduzione od aumento della sostanza grigia, sostanza bianca o spazi liquorali) fra casi e controlli ai quali si assegna un valore *p* (corretto per confronti multipli) che indica la

significatività statistica del *cluster* stesso (Ashburner and Friston, 2000; Good et al., 2001).

La VBM dunque permette di analizzare, in gruppi di pazienti omogenei e senza ipotesi a priori, la distribuzione nell'intero sistema nervoso centrale del volume della sostanza bianca, grigia e del liquido cerebrospinale

Profilo delle anomalie VBM in AD e MCI

Svariati studi VBM hanno valutato le differenze nei volumi regionali di sostanza grigia in campioni di AD in confronto a soggetti sani. Il risultato più consistente che emerge da tali studi è la presenza di atrofia nelle strutture del lobo temporale mesiale quali ippocampo, amigdala, corteccia entorinale e giro paraippocampale (Rombouts et al., 2000; Xie et al., 2006; Kinkingnéun et al., 2008), che sono già evidenziabili in stati precoci di malattia. Comunque, con un minor grado di riproducibilità, sono state descritte riduzioni di volume in altre aree cerebrali, che includono la neocortex temporale (Baron et al., 2001; Matsuda et al., 2002), parietale (Xie et al., 2006; Frisoni et al., 2002), l'insula, il precuneo, la corteccia del cingolo anteriore, del cingolo posteriore (Frisoni et al., 2002), la corteccia frontale (Xie et al., 2006; Frisoni et al., 2002), il talamo ed il caudato; infine, riduzioni di volume AD-correlate sono state occasionalmente riportate nel putamen, cuneo, corteccia occipitale ed ipotalamo (Xie et al., 2006). Essendo l' MCI associato con un aumentato rischio di AD (Petersen et al., 1999) variazioni potenziali di morfologia globale e regionale associate con l'MCI sono di speciale interesse. Dato questo assunto, i pazienti con MCI dovrebbero condividere alcune anomalie di *neuroimaging* con i pazienti AD, sebbene di minor intensità. Infatti, un certo numero di lavori VBM hanno dimostrato anomalie regionali MCI-correlate della sostanza grigia simili a quelle osservate nei pazienti AD. Queste includono: atrofia dell'ippocampo e dell'amigdala e riduzione della sostanza grigia in altre regioni -

sebbene in maniera più circoscritta di quanto descritto nell'AD - che interessano principalmente la neocortex frontale e temporo-parietale e, meno frequentemente, deficit della sostanza grigia nel giro del cingolo, nell'insula, nel talamo e nel nucleo caudato (Pennanen et al., 2004; Bozzali et al., 2006; Shiino et al., 2006; Chételat et al., 2002; Bell-McGinty et al., 2005). Quando confrontati direttamente con gli AD, i pazienti MCI presentano relativo risparmio delle cortecce associative posteriori, del cingolo posteriore e dell'amigdala sinistra (Karas et al., 2004; Chételat et al., 2002). Studi di VBM di tipo longitudinale, interessati ad identificare quali tra i pazienti MCI fossero destinati a sviluppare AD (Chételat et al., 2005) hanno dimostrato che in questi ultimi esiste una maggiore atrofia nelle aree temporali e del cingolo posteriore e del precuneo rispetto ai "non converters".

Studi di correlazione VBM-misure neuropsicologiche

Accanto al più comune utilizzo di confronto tra gruppi (cioè l'analisi di coorte), la VBM permette di poter effettuare analisi di regressione per esplorare possibili correlazioni tra le performance a test cognitivi e aspetti di morfologia cerebrale locale. Tale tipo di analisi sono state effettuate in vari gruppi di pazienti, inclusi quelli con schizofrenia (Rush et al., 2007), ipertensione arteriosa (Gianaros et al., 2006), fibromialgia (Luerding et al., 2008) ed afasia primaria (Amici et al., 2007). Questi lavori hanno indagato primariamente la *working memory* e le funzioni esecutive. Ad oggi, solo pochi studi hanno utilizzato la VBM per valutare correlazioni tra performance cognitiva e morfologia locale cerebrale in pazienti AD (Di Paola et al., 2007; Thomann et al., 2008; Berlinger et al., 2008) e MCI (Chételat et al., 2003; Hamalainen et al., 2007; Barbeau et al., 2008; Thomann et al., 2008) mostrando che riduzioni volumetriche nell'intero encefalo o in circoscritte regioni cerebrali quali l'ippocampo, la corteccia entorinale, il giro paraippocampale, il giro temporale medio, il giro del cingolo anteriore e la

corteccia parietale posteriore possono essere associate con una peggior performance cognitiva globale o con specifici deficit nella memoria a lungo termine, visuo-spaziali, delle funzioni esecutive e di calcolo (Di Paola et al., 2007; Thomann et al., 2008; Berlingeri et al., 2008). D'altra parte per MCI ed AD, è di particolare interesse la performance a test di memoria episodica. In un recente lavoro (Schmidt-Wilke e tal., 2009) condotto in 36 soggetti (18 MCI e 18 controlli), attraverso una analisi di regressione è stato dimostrato che i punteggi a test di memoria verbale (richiamo immediato) correlavano con valori della sostanza grigia nella parte anteriore dell'ippocampo sinistro, mentre la performance al richiamo differito correlava con valori di sostanza grigia nella parte posteriore dell'ippocampo sinistro e nel giro fusiforme ed entrambi con la parte posteriore del precuneo; è stato pertanto ipotizzato che le regioni anatomiche associate con la memoria verbale a lungo termine e con la *working memory* fossero strutturalmente segregate all'interno dell'ippocampo. In un altro recente ed elegante lavoro (Serra et al., 2010) il deficit mnesico indagato in pazienti AD ed MCI correlava con l'atrofia in alcune strutture temporali mesiali e con l'atrofia del precuneo.

La degenerazione della sostanza bianca nel declino cognitivo: metodiche di analisi e profilo delle anomalie

Come precedentemente accennato, l'attenta analisi istologica dei cervelli di individui affetti da AD ha rivelato il probabile substrato del deficit mnesico nella degenerazione preferenziale delle cortecce perinale ed entorinale, che impedisce verosimilmente il trasferimento di informazioni dalla neocortex all'ippocampo (Ball, 1978; Braak & Braak, 1991; Gomez-Isla et al., 1996; Hyman et al., 1984, 1986), degradando così la processazione e l'immagazzinamento dell'input sensitivo. Lo strato II della corteccia entorinale mostra infatti profonde alterazioni, che includono la perdita sostanziale di

neuroni anche negli stadi precoci della malattia (Gomez-Isla et al., 1996). La zona di proiezione delle terminazioni di queste fibre nel giro dentato della formazione ippocampale è anch'essa caratterizzata da alterazioni degenerative, che esitano in una disconnessione tra corteccie associative e limbica (Hyman et al., 1984, 1986) implicando quindi che il danno della connettività regionale possa in effetti contribuire al declino cognitivo. Studi istologici hanno dimostrato che anche la sostanza bianca degenera in AD (Brun e Englund, 1986; Englund e Brun, 1990; Englund et al., 1988; Hyman et al., 1986). Brun e Englund (1986) hanno riportato degenerazione, perdita assonale e oligodendriale con gliosi nelle sostanza bianca profonda, indipendente dalle alterazioni della sostanza grigia, nel 60% di pazienti affetti da AD. Gli Autori hanno suggerito che la degenerazione potesse essere potenzialmente legata a fattori di comorbidità come l'ipertensione. Tuttavia, sono state riportate alterazioni della sostanza bianca all'autopsia di individui affetti da AD pura, senza presenza di alterazioni cerebrovascolari (Sjobeck et al., 2006). Inoltre la mielina è ridotta nella via perforante, la principale via di proiezione neocorticale di informazioni dalla corteccia entorinale alle cellule granulari del giro dentato nella formazione ippocampale (Hyman et al., 1986). Questi reperti suggeriscono che almeno alcune delle alterazioni della sostanza bianca non siano dovute a fattori di comorbidità, ma che siano verosimilmente associate con il processo patologico dell'AD che include la patologia corticale temporo-mesiale. Il coinvolgimento patologico della via perforante e la riduzione dell'integrità della mielina di questo fascicolo sottolinea la potenziale influenza della connettività regionale nella propagazione degli eventi neurodegenerativi. Quindi, secondo questi dati il danno della sostanza bianca è suggestivo di degenerazione Walleriana che si verifica secondariamente alla perdita neuronale delle corteccie associative (Brun and Englund, 1986). Le alterazioni della sostanza bianca riscontrate nell'AD potrebbero però essere spiegate anche dal modello della "retrogenesi" (Reisberg et al., 1999), secondo cui la

degenerazione riflette un danno della mielina che si sviluppa seguendo un pattern inverso rispetto a quello della mielogenesi. In accordo con questo modello, i fasci e le vie costituite da fibre di grosso calibro, le prime a mielinizzarsi nello sviluppo, come le fibre motorie primarie, sono le ultime ad essere interessate dal processo neuropatologico dell'AD; al contrario, i fasci e le vie costituite da fibre di piccolo calibro, come le fibre associative neocorticali e allocorticali, sono le prime ad essere colpite dal processo neurodegenerativo (Bartzokis, 2004). Secondo il modello della "retrogenesi", poiché le vie di associazione cortico-corticale sono quelle costituite da fibre più tardivamente mielinizzate, seguite dalle vie limbiche e dalle commissure (Kinney et al., 1988), esse sono particolarmente vulnerabili alla degenerazione dell'AD. D'altra parte molte di queste fibre tardivamente mielinizzate si connettono alle strutture temporo-mesiali ed è quindi possibile che queste alterazioni della sostanza bianca possano riflettere anche la degenerazione Walleriana secondaria alla perdita neuronale (Coleman, 2005).

Una domanda aperta è se questo principio di degenerazione nelle regioni connesse anatomicamente si estenda al di là dei reperti documentanti nella via perforante. Il panorama di degenerazione dei tratti assonali nell'AD precoce potrebbe perciò includere la sostanza bianca del giro paraippocampale ed il fascio del cingolo posteriore; ci potrebbe essere una estensione della degenerazione della sostanza bianca da queste aree fino ad aree laterali, specialmente, posteriori temporo-parietali; la degenerazione preferenziale di queste cortecce associative posteriori potrebbe portar alla degenerazione di connessioni di sostanza bianca interemisferiche che passano attraverso il corpo calloso caudale; le fibre che connettono il lobo temporale mesiale e il diencefalo attraverso il fornice potrebbero degenerare e ci potrebbe essere un relativo risparmio della sostanza bianca nelle aree prefrontali, nel polo temporale e nelle aree occipitali caudali (Acosta-Cabronero et al., 2009).

Il passo successivo agli studi anatomo-patologici è stata la ricerca di tali alterazioni *in vivo*.

Il diffusion tensor imaging (DTI)

La mappatura delle alterazioni dei tratti di sostanza bianca è al momento uno dei maggiori temi di ricerca per capire lo sviluppo, l'invecchiamento e la patologia del sistema nervoso centrale. Il diffusion tensor imaging (DTI) è stato estensivamente applicato per studiare la base regionale della degenerazione tissutale in una varietà di condizioni cliniche, incluso l'invecchiamento fisiologico (Moseley et al., 2002; Pfefferbaum et al., 2000; Sullivan and Pfefferbaum, 2006). Il DTI permette la quantificazione della diffusione tridimensionale dell'acqua dentro i tessuti mediante la definizione di due parametri denominati diffusività media (MD) ed anisotropia frazionale (FA) (Basser, 1995; Basser and Pierpaoli, 1996), dà informazioni riguardo alla forma, alla grandezza e all'orientamento delle strutture cerebrali e permette di stimare anomalie nelle microstrutture del sistema nervoso, in particolare della sostanza bianca dove le guaine mieliniche creano barriere che ostacolano la diffusione protonica perpendicolarmente all'assone, mentre la favoriscono lungo il maggior asse dell'assone stesso. In particolare, la FA descrive il grado di anisotropia di una porzione di tessuto, ovvero la direzione prevalente della diffusione nello spazio delle molecole di acqua: con le mappe di FA è possibile individuare i fasci di sostanza bianca in base alla loro direzione. La MD è una misura media di diffusione che fornisce il grado medio di diffusività dell'acqua nel tessuto nervoso considerato globalmente (sostanza grigia e sostanza bianca) e rappresenta un indice più generale di organizzazione strutturale. Un danno delle fibre si traduce in una riduzione della FA ed un aumento della MD anche in aree encefaliche in cui il segnale dell'encefalo è normale nelle immagini convenzionali.

Più recentemente è stato dimostrato che la diffusività può essere ulteriormente suddivisa in componenti assiali e radiali, con informazioni relative alla alterazione selettiva dell'assone o della mielina (Song et al., 2002; 2003); in particolare vengono misurati il coefficiente di diffusione lungo la direzione di massima apparente diffusione (λ_1 o diffusività assiale) e i due coefficienti di diffusione lungo le due direzioni ortogonali all'interno del piano che passa perpendicolarmente alla principale direzione di diffusione (RD o diffusività radiale che è la media dei due coefficienti).

Tract-based spatial statistics (TBSS)

Il Tract-based spatial statistic (TBSS) è un metodo di recente introduzione (Smith et al., 2006; Smith et al., 2007), automatico e osservatore indipendente, di allineamento delle mappe di FA, MD, λ_1 , RD di gruppi di soggetti, che permette l'analisi *voxel-wise* di dati di DTI. L'utilizzo del TBSS è molto complesso e richiede delle tappe preliminari al fine di eliminare errori nelle sequenze analizzate. Per prima cosa si acquisiscono delle immagini T2 pesate per valutare la presenza di anomalie, quindi, si procede alla valutazione delle immagini DTI pesate per evidenziare artefatti di movimento che potrebbero inficiare l'applicazione del TBSS su queste stesse immagini. Oggi è possibile processare queste immagini utilizzando la TBSS-tool facente parte del programma FSL sviluppato dall'Oxford Centre for Functional MRI of the Brain (FMRIB).

L'approccio TBSS comprende quattro diversi passaggi che possono essere così riassunti:

1. identificazione di strutture di riferimento comuni ("*target*"), con allineamento delle immagini di FA di tutti i soggetti a questo target,
2. creazione della media di tutte le immagini allineate di FA e di un immagine di "FA scheletrica media" che rappresenta la soglia,

3. proiezione di ogni singola immagine di FA all'interno dello scheletro,
4. analisi statistica, in modo "voxel-wise", dei dati di "skeleton-space FA" dei soggetti (Smith et al., 2007).

Profilo delle anomalie DTI in AD e MCI

Rose e coll. hanno dimostrato alterate misure di diffusione nello splenio del corpo calloso, nel fascicolo longitudinale superiore, nel cingolo, e nella capsula interna di pazienti con AD e nella sostanza bianca paraippocampale, talamica e del cingolo in soggetti con MCI (Rose et al., 2006). Altri studi hanno trovato alterazioni delle misure di diffusione nei pazienti affetti da AD nel fascicolo uncinato e in quello occipitale inferiore (Taoka et al., 2006), nel corpo calloso e nella sostanza bianca dei lobi frontali, parietali e temporali (Bozzali et al., 2002) ed è stato dimostrato che alterazioni nelle misure di diffusione della sostanza bianca lobare posteriore in AD differivano da quelle osservate nell'invecchiamento fisiologico (Head et al., 2004; Medina et al., 2006). I meccanismi delle alterazioni della sostanza bianca nell'AD sono stati indagati attraverso l'analisi contemporanea della diffusività assiale e radiale, ma ancora non è presente una visione univoca su quale possa essere il meccanismo patologico primario, se cioè la compromissione della mielina (Choi et al., 2005) o il danno assonale (Huang et al., 2007). Un lavoro molto recente condotto in 20 pazienti affetti da AD ed in 54 anziani non dementi ha evidenziato alterazioni bilaterali della FA nel precuneo e maggiori alterazioni della diffusività assiale nella sostanza bianca paraippocampale, suggerendo che la patologia in questa regione include una qualche forma di demielinizzazione (Salat et al., 2010). Un altro recente lavoro su 25 pazienti AD e 13 controlli di pari età, focalizzatosi sulle diverse misure di diffusione, ha evidenziato che l'aumento assoluto (assiale, radiale e medio) della diffusività nell'AD era altamente più significativo ed ampiamente più sensibile delle riduzioni della FA (Acosta-Cabronero et al., 2009). In

particolare, le prime tre misure identificavano alterazioni della sostanza bianca confluenti nel giro paraippocampale e nel cingolo posteriore, estendendosi lateralmente nelle adiacenti regioni temporo-parietali così come nello splenio e nel fornice, in accordo con un pattern di degenerazione dei tratti che connettono il circuito di Papez (Acosta-Cabronero et al., 2009).

Studi di correlazione DTI-misure neuropsicologiche

Di nuovo, come già verificato per gli studi VBM sulla sostanza grigia, accanto al più tradizionale confronto tra gruppi, si può effettuare una analisi di regressione al fine di ricercare le possibili correlazioni tra alterazioni della sostanza bianca, evidenziate tramite DTI, e punteggi a test neuropsicologici. Considerando le varie misure di DTI come misure specifiche dell'integrità dei tratti di sostanza bianca, queste possono indirettamente essere misura della connettività strutturale. Per esempio, è stata riportata una robusta associazione tra riduzione dell'integrità del fascio fronto-occipitale inferiore destro ed il deficit età-correlato nella processazione e percezione dei volti (Thomas et al., 2008).

Ad oggi solo un lavoro, peraltro molto recente, è stato condotto utilizzando tale tipo di analisi su pazienti affetti da declino cognitivo: Serra et al. (2010) hanno studiato 9 pazienti AD, 16 pazienti MCI e 13 soggetti di controllo e hanno mostrato la presenza di correlazioni tra performance a prove di memoria a lungo termine e FA nella radiazione talamica anteriore, nel fornice e nel ginocchio del corpo calloso. In questo lavoro, ben condotto dal punto di vista metodologico, emerge comunque la limitazione derivante dalla bassa numerosità del campione e la necessità di ampliare la popolazione includendo soggetti con un ampio *range* di declino cognitivo.

OBIETTIVI

Ci sono ormai forti evidenze che la neuropatologia dell'AD sia presente molti anni prima che la sintomatologia si manifesti (Braak and Braak, 1997; Bennet et al., 2006) e che il primo sintomo cognitivo, cioè il disturbo di memoria, rappresenti una falla in un meccanismo di compenso e di riserva cerebrale, un punto critico nella evoluzione successiva del danno neuronale prodotto dalla patologia (Smith, 2007). È ormai noto inoltre che le alterazioni neuropatologiche dell'AD coinvolgono sia la sostanza grigia che la bianca, e le anomalie in entrambi i tessuti sono state correlate con misure di declino cognitivo in pochi lavori e con popolazioni di limitata numerosità. Sta diventando quindi sempre più evidente che per raggiungere una visione globale dell'evoluzione dell'AD, gli studi debbano essere basati sui dati neuropsicologici ed anatomici derivanti da un'ampia popolazione di pazienti in diversi stadi di malattia.

Su questa base gli scopi del presente studio sono stati:

- indagare, in una estesa popolazione di soggetti affetti da Disturbo Soggettivo di Memoria, Mild Cognitive Impairment e Malattia di Alzheimer lieve, atta a rappresentare così una sorta di *continuum* del disturbo di memoria, le possibili correlazioni tra deficit mnesico ed atrofia della sostanza grigia misurata attraverso la VBM
- indagare, nella stessa popolazione, l'eventuale presenza di una associazione tra deficit mnesico ed alterazioni microstrutturali della sostanza bianca misurate attraverso la DTI-TBSS

al fine di fornire una visione completa sui differenti meccanismi fisiopatologici (atrofia della sostanza grigia, degenerazione Walleriana, disconnessione cerebrale) e sulle loro possibili associazioni con gli aspetti clinici del declino cognitivo.

SOGGETTI E METODI

Soggetti

Nell'ambito di uno studio longitudinale sulle fasi precliniche della demenza, abbiamo arruolato 86 soggetti che, afferiti alla Clinica Neurologica I del Policlinico di Careggi dal gennaio 2006 al dicembre 2008, lamentavano deficit mnesici, e 15 controlli, selezionati tra coniugi e parenti non consanguinei dei soggetti in studio. Ogni soggetto ha fornito il proprio consenso informato per la partecipazione allo studio. Tutti sono stati sottoposti ad un protocollo standardizzato che include una raccolta dettagliata di dati anamnestici familiari e personali, una visita neurologica, un'estesa valutazione neuropsicologica, la tipizzazione del genotipo APOE e l'esecuzione di RM encefalo con un apparato da 1.5 T. Sono stati esclusi dallo studio quei soggetti affetti da patologia cerebrovascolare, da altre malattie neurologiche o malattie sistemiche in atto, coloro che avevano una storia di pregresso trauma cranico, sintomi psicotici, depressione maggiore, alcolismo o abuso di sostanze stupefacenti. Un follow-up clinico neuropsicologico e strumentale è stato effettuato a distanza di due anni dall'ingresso nello studio (è quindi tuttora in corso).

La valutazione neuropsicologica

Tutti i soggetti in studio, inclusi i controlli, sono stati sottoposti alla versione italiana del Test di Intelligenza Breve (TIB), prova di lettura finalizzata ad ottenere una stima dell'intelligenza pre-morbosa (Sartori et al.,1995, Colombo et al., 2002). Le funzioni cognitive sono state valutate per mezzo di un'estesa batteria, già standardizzata su 146 soggetti normali, che include una scala di depressione (Hamilton Rating Scale for Depression - HRSD), misure globali (Test di Informazione-Memoria-Concentrazione - IMCT - e Mini Mental State Examination – MMSE; Folstein, 1975) così come test

neuropsicologici che esplorano la memoria a breve e lungo termine, verbale e spaziale (Digit span, Test di Corsi, Cinque Parole -*Acquisizione, Richiamo a 10' e 24h-*, Parole Accoppiate -*Acquisizione, Richiamo a 10' e 24h-*, Breve Racconto -*Richiamo Immediato e dopo 10'-*), il linguaggio (Test dei Gettoni e Fluenza Verbale per Categoria-Set Test), l'orientamento, la lettura, la scrittura ed il calcolo (Clifton-Assessment-Schedule), la performance psicomotoria (Gibson Maze) e le capacità visuo-spaziali (Copia di Disegni) (Bracco et al., 1990). Da cinque test, selezionati dalla batteria, in grado di meglio differenziare vari livelli di deficit cognitivo (Bracco et al., 1990) si ottiene la *Canonical Variable* (CV1), un punteggio composto, indice del disturbo di memoria; più il punteggio è negativo e migliore è la prestazione ad alcune prove di memoria contenute nella batteria. Ogni soggetto è stato inoltre sottoposto ad un test di memoria visuo-spaziale a lungo termine (Figura Complessa di Rey-Osterrieth-Rey, 1941), ad un test di memoria ecologica (Rivermead Behavioural Memory Test - RMBT- Wilson et al. 1989) e a prove di attenzione e funzioni esecutive (Dual Task - Baddeley et al. 1997), Trail Making A-B Test (Reitan, 1958), Test di Stroop (Stroop, 1935) e Fluenza Verbale per Lettera (Novelli et al., 1986). In particolare, la differenza dei tempi di esecuzione tra parte B e parte A del Trail Making Test è stata impiegata come indice della componente esecutiva della prova (TMT B-A). I punteggi ai test sono corretti per età e scolarità. Il tempo complessivo per la somministrazione della batteria è di circa 90 minuti.

Acquisizione ed analisi delle immagini RM

I pazienti ed i controlli hanno eseguito un esame RM in un unico centro con un apparato da 1.5 T (Philips Intera, Best the Netherland) con gradiente massimo di 33mT/m e bobina a tecnologia SENSE. Per ciascun soggetto è stata acquisita una sequenza 3D turbo gradient echo T1 pesata a voxel isotropico di 1 mm di [tempo di ripetizione (TR) =

8.1 ms; tempo di echo (TE) = 3.7 ms; flip angle = 8°; tempo di inversione = 764 ms; campo di vista (FOV) = 256 mm; matrice 256x256, 160 fette contigue, spessore = 1mm]. Allo scopo di valutare le eventuali alterazioni del segnale della sostanza bianca encefalica sono state inoltre acquisite immagini DP/T2 assiali (TR= 2242 ms; TE = 90/20 ms; FOV = 230 mm; 40 fette contigue; spessore 5 mm) e immagini FLAIR coronali (TR = 11000 ms; TE = 140 ms; FOV = 230 mm; 40 fette contigue; spessore 5 mm).

Analisi delle immagini

Valutazione soggettiva. Un operatore con sette anni di esperienza nella diagnostica RM, cieco ai dati clinici e neuropsicologici ha valutato le immagini FLAIR e DP/T2 di tutti i soggetti per valutare l'estensione di eventuali aree di per intensità del segnale nelle sequenze T2-pesate, la cosiddetta leucoaraiosi (LA). La quantificazione di tali alterazioni di segnale è stata ottenuta utilizzando una scala visiva di valutazione semiquantitativa proposta a tale scopo da Fazekas e coll. (Fazekas et al., 1997). Tale scala ha un range da 0 a 6 e ha il pregio, per la semplicità di utilizzo, di avere una buona corrispondenza inter-operatore (Mascalchi et al., 2002).

VBM eDTI. In via preliminare le immagini T1 sono state valutate visivamente per individuare artefatti di movimento, prima di proseguire all'elaborazione dei dati. Le analisi di seguito riportate riguardano quindi soltanto le sequenze prive di artefatti di movimento. L'analisi dei dati è stata eseguita su un PC dotato del software FMRIB Software Library (FSL) 4.0 package (FMRIB Image Analysis Group, Oxford UK) (Smith et al., 2004).

Protocollo VBM. I dati strutturali sono stati analizzati utilizzando FSL-VBM, un'analisi di tipo voxel-based morphometry (Ashburner and Friston, 2000; Good et al., 2001) inclusa nel software FSL 4.0 (FMRIB Software Library) (Smith et al., 2004). Per prima

cosa è stato estratto l'encefalo da ciascuna immagine T1 escludendo le componenti del cranio non appartenenti al sistema nervoso centrale utilizzando il programma BET (Brain Extraction Tool) (Smith, 2002). Gli encefali così ottenuti sono stati segmentati in sostanza grigia, sostanza bianca e spazi liquorali attraverso FAST (FMRIB's Automated Segmentation Tool) versione 4 (Zhang et al., 2001). I volumi di sostanza grigia così ottenuti sono stati allineati allo spazio standard MNI152 standard utilizzando una registrazione affine effettuata dal programma FLIRT (FMRIB's Linear Image Registration Tool) (Jenkinson et al., 2001, 2002), seguito da una registrazione non-lineare attraverso FNIRT (FMRIB's Non-linear Image Registration Tool)(Andersson et al., 2007a, 2007b), che utilizza una rappresentazione “b-spline” della registrazione “warp field” (Rueckert et al.,1999). Le immagini così ottenute sono “mediate” al fine di creare un *template* “study-specific”, a cui le immagini originali di sostanza grigia sono ri-registrate in modo non-lineare. Le immagini di volume parziale registrate vengono poi modulate (al fine di correggere le espansioni e le contrazioni locali) dividendo per il Jacobiano del “warp field”. Le immagini modulate e segmentate subiscono poi lo *smoothing* attraverso un kernel Gaussiano isotropico con un sigma che può essere variato dall'operatore.

Protocollo DTI. Attraverso il programma FSL sviluppato dall'Oxford Centre for Functional MRI of the Brain (FMRIB) sono state create le mappe di Fractional Anisotropy (FA), Mean Diffusivity (MD), λ_1 o diffusività assiale e diffusività radiale (RD). Le mappe sono poi state inserite in TBSS in modo da ottenere una proiezione di ogni singola immagine FA all'interno di una immagine di “FA scheletrica media”. Lo scheletro è ottenuto con allineamento delle immagini di FA tutti i soggetti all'interno di uno spazio comune definito da una immagine “*target*” (il *template* fornito dal FMRIB). I dati FA di ciascun soggetto sono poi proiettati nello scheletro e viene ottenuta una analisi statistica, in modo “*voxel-wise*”, dei dati di “*skeleton-space FA*” dei soggetti

(Smith et al., 2007). Le stesse applicazioni e procedure di normalizzazione vengono applicate alle immagini MD, $\lambda 1$, RD.

Analisi statistica

I dati clinico-demografici e neuropsicologici sono stati analizzati utilizzando il programma SPSS (versione 13.0). L'ANOVA con la correzione post-hoc di Bonferroni è stata impiegata per i confronti tra gruppi su variabili continue, il test del Chi-quadro su variabili non continue. È stato considerato un valore significativo di $p < 0.05$.

Le analisi di correlazione tra risultato di VBM, FA, MD, $\lambda 1$, RD ed età dei 101 soggetti e poi tra risultati di VBM, FA, MD, $\lambda 1$, RD e punteggio ai test neuropsicologici sono state effettuate con il software Randomise 2.0 incluso in FSL 4.0, utilizzando come strumento statistico un test di inferenza non parametrico basato sulla permutazione, che tiene conto del raggruppamento per cluster (Nichols and Holmes, 2002). Abbiamo usato una soglia di significatività statistica restrittiva (soglia cluster-based $t > 3$, $p < 0.05$, corretta per comparazioni multiple) (Smith et al., 2006).

In modo da ridurre il numero di test statistici (rischio di errore di tipo I) sono stati introdotti nell'analisi di correlazione soltanto i punteggi ad alcuni test neuropsicologici, quali test di memoria a lungo termine sia verbale che visuo-spaziale (CV1, RMBT, Breve Racconto, richiamo della Figura Complessa di Rey-Osterrieth), una prova che esplora le funzioni attentive/esecutive (Trail Making Test), ed un test di comprensione verbale (Test dei Gettoni).

Preliminarmente è stata valutata la correlazione tra dati strutturali RM ed età nell'intero campione di pazienti e controlli. L'età è stata poi inserita come covariata "non di interesse" nell'analisi di correlazione tra il punteggio ai test neuropsicologici e i dati VBM e DTI. Per la descrizione topografica delle aree statisticamente più significative

all'interno dei *clusters* di sostanza grigia abbiamo usato le coordinate fornite dall'atlante del Montreal Neurological Institute (MNI). L'identificazione dei tratti anormali di sostanza bianca rivelati dal TBSS si è basata sugli Atlanti della Johns Hopkins University (Wakana et al., 2004), di Schmahmann et al. (2007) e sul libro di testo "Cranial neuroimaging and Clinical neuroanatomy" di Kretschmann e Weinrich (2004).

RISULTATI

Caratteristiche clinico-demografiche della popolazione

In base alla valutazione clinico-neuropsicologica i pazienti sono stati classificati come affetti da Disturbo Soggettivo di Memoria (DSM, n=35, 24 femmine, 11 maschi, età 65 ± 9 anni), Mild Cognitive Impairment amnesico (MCI, n=30, 17 femmine, 13 maschi, età 69 ± 8 anni) e Malattia di Alzheimer in fase iniziale (AD, n= 21, 18 femmine, 3 maschi, età 74 ± 7 anni). Abbiamo formulato la diagnosi di DSM per i soggetti che lamentavano deficit mnesici ma che presentavano punteggi nella norma a tutti i test neuropsicologici effettuati. I pazienti affetti da MCI amnesico sono stati diagnosticati secondo i criteri adottati universalmente (Petersen *et al.*, 2001). I criteri diagnostici utilizzati per l'AD erano quelli dell' NINCDS-ADRDA (McKhan et al., 1984). In *Tab.1* vengono fornite le caratteristiche clinico-demografiche e neuropsicologiche (relativamente ai test inseriti nell'analisi di correlazione con i dati RM) di ciascun gruppo e vengono presentati i confronti tra gruppi. I pazienti affetti da AD risultano avere un'età più avanzata e minor anni di scolarità rispetto ai soggetti con DSM e presentano performance peggiori a tutti i test rispetto a tutti gli altri gruppi. I pazienti con MCI hanno peggiori prestazioni rispetto ai controlli e rispetto ai soggetti con DSM a test che esplorano le funzioni mnesiche. Non si è rilevata alcuna differenza ai test neuropsicologici tra i pazienti con DSM e controlli.

Valutazione RM soggettiva

Il punteggio LA non è significativamente differente tra controlli sani (media 1.01 ± 0.7) e pazienti con disturbo soggettivo di memoria (0.89 ± 0.8), pazienti con MCI (0.97 ± 0.9) e pazienti con AD in fase precoce (1.19 ± 0.9).

VBM

Correlazioni tra volume della sostanza grigia ed età. L'età è risultata correlare inversamente con il volume della sostanza grigia in molteplici ed estese strutture encefaliche sia sopra che sottotentoriali (*Fig. 1 e Tab. 2*).

Correlazioni tra volume della sostanza grigia e dati neuropsicologici. Relativamente ai test che esplorano la memoria a lungo termine si è osservata una correlazione tra punteggio CV1 e volume della sostanza grigia a livello dell'amigdala di sinistra, del precuneo bilateralmente, e dell'ippocampo bilateralmente (*Fig. 2*), tra il punteggio all'RMBT e ed il volume dell'amigdala, dell'ippocampo, del precuneo, del giro del cingolo posteriore, della corteccia laterale dei lobi occipitale e temporale e del giro parietale superiore bilateralmente (*Fig. 3*), e tra il punteggio al Breve Racconto ed il volume dell'amigdala e dell'ippocampo di destra (*Fig. 4*).

Si è evidenziata una correlazione tra la performance al Trail Making Test ed il volume dell'amigdala e dell'ippocampo di destra e del giro fusiforme destro. Non abbiamo osservato correlazioni tra punteggi al test di rievocazione della Figura Complessa di Rey-Osterrieth e al Test dei Gettoni ed il volume regionale della sostanza grigia encefalica.

Le coordinate dei volumi delle regioni di sostanza grigia encefalica che correlano con i punteggi dei test neuropsicologici sono riportati in *Tab. 3*.

TBSS

Correlazioni tra alterazioni della sostanza bianca ed età. L'età è risultata correlare con tutte le misure di DTI in maniera diffusa a livello della sostanza bianca (Fig. 5).

Correlazioni tra alterazioni della sostanza bianca e dati neuropsicologici.

I valori di FA sono risultati inversamente correlati con il punteggio CV1 nella sostanza bianca sottocorticale temporo-parietale, nel fascicolo longitudinale inferiore, nel fornice, nel peduncolo temporale, nel fascicolo longitudinale superiore, nel corpo e nello splenio del corpo calloso (Fig. 6) e direttamente correlati con il punteggio al richiamo della Figura di Rey-Osterrieth a livello del tronco e dello splenio del corpo calloso, della corona radiata bilateralmente, della capsula esterna sinistra e del braccio posteriore della capsula interna (Fig. 7). È stata evidenziata inoltre una correlazione diretta tra FA e punteggio al test dei Gettoni nel corpo calloso e nella sostanza bianca del precuneo di sinistra e del giro del cingolo.

I valori di RD sono risultati direttamente correlati con il punteggio CV1 nel fascicolo fronto-occipitale inferiore destro e nel peduncolo del temporale e nella corona radiata superiore bilateralmente ed inversamente correlati con i punteggi al RMBT nel fascicolo fronto-occipitale destro, nella corona radiata superiore e nella porzione posteriore del corpo calloso bilateralmente.

I valori di $\lambda 1$ sono risultati direttamente correlati con il punteggio al Breve Racconto nel corpo e nel ginocchio del corpo calloso e nel fascicolo fronto-occipitale sinistro (Fig. 8).

I valori di MD non sono risultati correlare significativamente con alcuna misura neuropsicologica.

Le coordinate dei cluster di sostanza bianca che correlano con i punteggi ai test neuropsicologici sono riportati in *Tab. 4-5-6*.

DISCUSSIONE

Le indagini neuropatologiche suggeriscono che i processi neurodegenerativi che si verificano nell'AD sono localizzati inizialmente nella corteccia entorinale, parte del lobo temporale mediale, e poi si estendono al corno di Ammone e alle altre regioni neocorticali (Braak and Braak, 1991; Gomez-Isla et al., 1996). Questa successione di eventi fisiopatologici riflette il progressivo accumularsi di deficit cognitivi. In questa prospettiva, i pazienti con MCI amnesico rappresentano il più precoce stadio - la comparsa del deficit mnesico - della patologia dell'AD individuabile attraverso strumenti clinici.

Ad oggi, molti lavori di *neuroimaging* hanno indagato le alterazioni strutturali cerebrali in pazienti affetti da AD e MCI (Bozzali et al., 2006; Chételat et al., 2005; Killiany et al., 2002; Karas et al., 2008), basandosi sull'idea generale che un progressivo accumulo di beta-amiloide e di grovigli neurofibrillari nel tessuto cerebrale si traduca effettivamente in una atrofia cerebrale diffusa e recenti studi di follow-up, che hanno utilizzato la VBM, hanno mostrato in pazienti con MCI amnesico una stretta associazione tra l'estensione dell'atrofia regionale della sostanza grigia e il rischio di conversione ad AD in breve tempo (Bozzali et al., 2006; Chételat et al., 2005; Chételat et al., 2008).

Alterazioni regionali della sostanza bianca sono state documentate sia in pazienti AD che in pazienti affetti da MCI, dove studi DTI-RM hanno riportato specifici *patterns* di anomalie regionali della sostanza bianca, che in alcuni casi erano correlate a misure di declino cognitivo (Rose et al., 2000; Bozzali et al., 2001). Damoiseaux e coll., utilizzando TBSS per indagare le alterazioni della sostanza bianca nell'invecchiamento e in presenza di AD, hanno riportato una riduzione della FA nel lobo temporale nei pazienti AD rispetto a soggetti sani appaiati per età (Damoiseaux et al., 2008).

I nostri dati, che si inseriscono pertanto all'interno di un contesto di ricerca in cui si sente la necessità ottenere un quadro completo dell'evoluzione ad AD, che si basi sia sulle informazioni neuropsicologiche che su quelle strutturali, confermano il ruolo delle aree temporo-parietali mesiali nei processi mnesici e contribuiscono ad arricchire la conoscenza delle relazioni tra il deficit di memoria episodica, la riduzione regionale di sostanza grigia cerebrale e le alterazioni microstrutturali della sostanza bianca in un ampio campione di soggetti affetti da diversi gradi di deficit cognitivo.

Correlazioni tra volume della sostanza grigia e performance neuropsicologica

Ad oggi, solo pochi studi hanno utilizzato la VBM per studiare i rapporti tra atrofia e deficit neuropsicologico in pazienti con AD e MCI ed hanno dimostrato che riduzioni volumetriche nell'intero encefalo o in circoscritte regioni cerebrali quali l'ippocampo, la corteccia entorinale, il giro paraippocampale, il giro temporale medio, il giro del cingolo anteriore e la corteccia parietale posteriore, possono essere associate ad una peggior performance cognitiva globale o a deficit specifici nella memoria a lungo termine, visuo-spaziali, delle funzioni esecutive e di calcolo (Berlingeri et al., 2008; Di Paola et al., 2007; Serra et al., 2010; Chetelat et al., 2003; Hamalainen et al., 2007; Barbeau et al., 2008; Thomann et al., 2008; Schmidt-Wilke et al., 2009).

Il nostro lavoro conferma il dato di correlazione fra il punteggio a test di memoria a lungo termine e l'area temporale mesiale, interessata bilateralmente per quanto riguarda il punteggio CV1 e RMBT e limitata all'ippocampo destro per il Breve Racconto. Questi dati sono in accordo con la letteratura che mostra correlazioni tra scarse abilità mnesiche a lungo termine, sia in fase di acquisizione che di richiamo, e l'atrofia nell'ippocampo e nelle altre aree dei lobi temporali nei pazienti affetti da MCI ed AD (Di Paola et al., 2007; Fjell et al., 2008).

L'associazione, riscontrata nel nostro lavoro, tra il deficit di memoria episodica (CV1) e l'atrofia nel precuneo bilateralmente appare in linea con la letteratura recente che indica un precoce interessamento di questa regione nella AD (Raji et al., 2009) ed un suo coinvolgimento nei processi mnesici. Il precuneo infatti, area ampiamente connessa attraverso fasci cortico-corticali con le adiacenti cortecce del cingolo posteriore e retrospleniali, è implicata nelle funzioni cognitive di "alto livello" tra cui la memoria episodica ed autobiografica (Cavanna and Trimble, 2006; Eustache et al., 2004). L'associazione tra atrofia del precuneo e deficit mnesico è inoltre stata riscontrata in un recente lavoro condotto con una metodica simile a quella utilizzata nel presente studio (Serra et al.; 2010).

Analogamente, la correlazione evidenziata tra punteggi a test di memoria episodica e comportamentale e il volume regionale a livello del cingolo posteriore si allinea con quanto presente in letteratura. L'ipometabolismo del giro del cingolo posteriore è infatti la più grave lesione metabolica della AD in fase precoce (Minoshima et al., 1997; Nestor et al., 2003) e, sebbene l'ipometabolismo del cingolo posteriore sia stato interpretato come una conseguenza remota della degenerazione della corteccia temporo-mesiale, recenti studi volumetrici di RM hanno evidenziato che anche quest'area è atrofica nella AD in fase iniziale (Choo et al., 2008; Pengas et al. 2010). La relazione tra cingolo posteriore e sistema colinergico, così come le sue connessioni con l'ippocampo e la regione paraippocampale è stata messa in causa nell'MCI e le anomalie del cingolo posteriore sono state correlate, attraverso lavori di RM funzionale, con la performance a test di richiamo differito, espressione della memoria episodica (Gündel et al., 2003).

La corteccia parietale, in particolare il giro parietale superiore bilaterale, è emersa nelle correlazioni tra volume regionale e punteggi al RMBT. Questo dato non è affatto sorprendente, in considerazione del notevole incremento di letteratura di *imaging* funzionale sul contributo delle cortecce parietali, incluso il lobulo parietale superiore,

nel richiamo di memorie episodiche (Cabeza et al., 2008) ed in particolare nella distinzione tra gli aspetti di familiarità/novità (Wagner et al., 2005), *item* facente parte dell'RMBT. Quindi, nel complesso, i nostri dati confermano il ruolo delle strutture parietali (soprattutto mesiali posteriori, quali il cingolo posteriore ed il precuneo) nel deficit di memoria episodica in associazione ed interscambio con le strutture amigdalopocampo-entorinali.

Il punteggio al Trail Making Test, prova che esplora l'attenzione e le funzioni esecutive, è inaspettatamente risultato correlare con il volume dell'ippocampo di destra. D'altra parte l'alto carico visuo-spaziale della prova potrebbe rendere ragione del pattern di lateralizzazione osservato; infatti il test indaga contemporaneamente sia la capacità di esplorazione spaziale attraverso l'esecuzione di un compito visuo-motorio, che la capacità di seguire mentalmente due sequenze alternate, con una manipolazione dell'informazione che implica continuamente di focalizzare e spostare l'attenzione nello spazio (Perry e Hodges, 1999). Pur non avendo riscontrato, come ci saremmo attesi per questo test, alcuna correlazione con le aree frontali, non è inaspettato il piccolo, ma significativo, cluster di correlazione a livello del giro fusiforme di destra, area associativa ad alta integrazione deputata al mappaggio della localizzazione spaziale di eventi sensitivi salienti e alla messa in atto di strategie motorie (Kim et al., 1999; Nobre et al., 1997).

In linea con quanto atteso è invece la mancata correlazione tra atrofia della sostanza grigia e il deficit delle funzioni linguistiche (Test dei Gettoni), deficit generalmente più marcato nei quadri di AD conclamati. Non è stata evidenziata inoltre alcuna correlazione tra volume regionale della sostanza grigia ed un test che esplora la memoria a lungo termine (richiamo differito della Figura Complessa di Rey-Osterrieth). Si può ipotizzare che l'analisi VBM sia meno efficace nell'individuare il substrato morfologico del deficit di esecuzione di un test sotteso ad un network neuronale molto

ampio, quale il richiamo differito di materiale visivo complesso, che prevede l'utilizzo di molte funzioni cognitive tra le quali la capacità di organizzazione del ricordo, squisitamente frontale, e di pianificazione visuo-spaziale (Di Paola et al., 2007).

In generale quindi possiamo affermare che i nostri dati confermano l'indubbio ruolo del giro del cingolo posteriore e del precuneo nei processi mnesici e si allineano con i risultati derivanti da studi con approcci metodologici diversi quali quelli esclusivamente clinico-neuropsicologici e di neuroimaging sia strutturale che funzionale.

Correlazioni tra alterazioni della sostanza bianca e performance neuropsicologica

Ad oggi è noto che le alterazioni patologiche dell'AD coinvolgono sia la sostanza grigia che quella bianca e le anomalie della connettività cerebrale sono considerate un tratto preminente dell'AD e dell'MCI (Delbueck et al., 2003; Rossini et al., 2007; Bracco et al., 2009). Il danno della sostanza bianca è suggestivo di degenerazione Walleriana che si verifica secondariamente alla perdita neuronale delle cortecce associative, in accordo con lavori neuropatologici *post-mortem* su AD che dimostrano perdita di mielina, di assoni e di oligodendrociti (Brun et al., 1986). In alternativa, le alterazioni della sostanza bianca riscontrate nell'AD potrebbero essere spiegate dal modello della "retrogenesi" (Reisberg et al., 1999), secondo cui la degenerazione riflette un danno della mielina che si sviluppa seguendo un *pattern* inverso rispetto a quello della mielogenesi, con una maggior vulnerabilità delle vie di associazione cortico-corticale, delle vie limbiche e delle commissure, costituite da fibre più tardivamente mielinizzate (Kinney et al., 1988; Stricker et al., 2009).

Gli studi DTI condotti in AD ed in MCI tipicamente mettono a confronto gruppi di pazienti con gruppi di controllo sani, appaiati per età, escludendo soggetti con danno vascolare significativo o fattori di rischio vascolare in modo da ridurre il contributo dei processi vascolari alla patologia della sostanza bianca. Tali lavori hanno mostrato

anomalie nella anisotropia della sostanza bianca delle corteccie frontali (Bozzali et al., 2002; Head et al., 2004), parietali (Bozzali et al., 2002; Medina et al., 2006) e temporali (Bozzali et al., 2002; Takaiashi et al., 2002; Xie et al., 2006). In particolare, il risultato più riprodotto è quello dell'alterazione della sostanza bianca temporale, le cui maggiori connessioni derivano dalla corteccia entorinale, dall'ippocampo e dall'amigdala a conferma dell'ipotesi che le anomalie della sostanza bianca temporale possono effettivamente essere dovute al processo neurodegenerativo dell'AD.

Nel nostro studio i valori di FA sono risultati inversamente correlati con il punteggio CV1, indicativo della memoria a lungo termine, nella sostanza bianca sottocorticale temporo-parietale, in linea con il precoce coinvolgimento di questi fasci di sostanza bianca in pazienti affetti da AD e MCI (Bozzali et al., 2002; Medina et al., 2006; Takahashi et al., 2002; Xie et al., 2006) e con il ruolo esercitato dalle strutture temporali nella acquisizione e nella rievocazione di nuove informazioni.

La correlazione, riscontrata nel nostro campione, tra performance a test che esplorano la memoria episodica sia verbale che visuo-spaziale (CV1, Breve racconto e richiamo della figura complessa di Rey-Osterrieth) e valori di FA e di λ_1 nel tronco e nello splenio del corpo calloso è in accordo con il reperimento di una ridotta anisotropia in questa area in AD rispetto ai controlli (Rose et al., 2000; Medina et al., 2006; Takahashi et al., 2002). Questo dato è riproposto anche da un recente studio di correlazione clinico-strutturale, metodologicamente quindi molto simile al nostro, in cui viene descritta una associazione tra FA nel ginocchio del corpo calloso e i punteggi ad una prova che esplora il richiamo differito di nuove informazioni (Serra et al., 2010). Si conferma quindi l'interessamento dei fasci del corpo calloso nei processi degenerativi dell'AD ed il suo coinvolgimento nel deficit mnesico, pur permanendo una discordanza relativamente alla porzione maggiormente colpita, se ginocchio, presumibilmente a causa della maturazione più tardiva di tale regione (Head et al., 2004; Xie et al., 2006) o splenio, implicato nel

pattern degenerativo che si verifica nei circuiti posteriori delle cortecce temporo-parietali (Rose et al., 2000; Medina et al., 2006).

La correlazione tra CV1, misura composita, indice della memoria a lungo termine, e FA nel fornice è in linea con i dati di Serra e coll. (2010), che mostrano una associazione tra punteggio ad un test di memoria a lungo termine e FA in questa area, notoriamente implicata nella connessione tra il lobo temporale mesiale e il diencefalo, in accordo quindi con un *pattern* di degenerazione dei tratti che connettono il circuito di Papez (Acosta-Cabronero et al., 2009).

La associazione tra memoria episodica (CV1) e FA nel fascicolo longitudinale superiore, composto da fibre bidirezionali che vanno dalle regioni frontali a quelle parietali, temporali ed occipitali, è in linea con la descrizione in AD della ridotta anisotropia a tale livello, reperto verosimilmente secondario alla degenerazione corticale (Rose et al., 2000; Medina et al., 2006; Xie et al., 2006) e con il ruolo delle cortecce frontali nel processo mnesico (Tulving et al., 1994).

È stata evidenziata inoltre una correlazione diretta tra FA e punteggio al test dei Gettoni - prova molto sensibile, ma scarsamente specifica, che esplora sì la comprensione verbale, ma anche la *working memory* e quindi aspetti mnesici ed attentivi – nel corpo calloso, nella sostanza bianca del precuneo di sinistra e del giro del cingolo, le cui fibre fanno parte integrante del sistema colinergico, notoriamente colpito nella AD (Selden et al., 1998; Gundel et al., 2003). Gli studi DTI in AD infatti hanno riportato una riduzione della FA in tali fibre; perciò la perdita dell'anisotropia nelle fibre del cingolo posteriore che connettono il giro paraippocampale ed il giro del cingolo può essere il risultato del processo patologico coinvolto nell'AD (Medina et al., 2006, Takahashi et al., 2002).

Infine, le alterazioni della sostanza bianca misurate attraverso la RD sono risultate correlare con il punteggio al test di memoria comportamentale/prospettica nel fascicolo fronto-occipitale bilateralmente, confermando il ruolo delle regioni frontali nel

“ricordarsi di ricordare” le intenzioni, cioè la memoria prospettica (Poppenk et al., 2010).

Nel complesso, l’attendibilità dei nostri risultati è confermata dalla congruenza sia con quelli ottenuti da studi trasversali di confronto tra pazienti AD/MCI e soggetti di controllo che con quelli derivanti dai pochi studi di correlazione clinico-strutturale (Rose et al., 2006; Zhang et al. 2007; Serra et al., 2010). I nostri dati quindi si affiancano ai precedenti nell’indicare la presenza di alterazioni microstrutturali della sostanza bianca prevalentemente a livello posteriore, e li confermano in un ampio campione di soggetti e con un metodo di analisi *voxel-wise* di recente introduzione. Occorre infatti sottolineare che i lavori pubblicati fino ad ora sull’argomento presentano alcune limitazioni, prima tra tutte la bassa numerosità del campione (meno di 80 soggetti negli studi di confronto tra gruppi, meno di 40 nei pochi studi di correlazione); alcuni sono condotti con il metodo delle ROI piuttosto che con una analisi statistica *whole-brain*, con il rischio, derivante dalla presenza di una ipotesi a priori, di perdere alcune correlazioni inaspettate ma potenzialmente congrue con il dato neuropatologico; nel caso dei confronti tra popolazioni di pazienti affetti da MCI e controlli, i lavori spesso mancano di un follow-up longitudinale che permetta eventualmente di confermare la diagnosi (Chua et al., 2008).

Avendo utilizzato tutte le misure nella loro totalità (FA e diffusività assiale, radiale e media), possiamo inoltre entrare, seppur al momento solo marginalmente, non essendo questo uno studio di confronto tra gruppi, nel recente dibattito relativo a quale sia la misura più adatta a svelare il processo neurodegenerativo di alterazione della sostanza bianca dell’AD (Acosta-Cabronero et al., 2009) e possiamo affermare una certa sovrapposizione tra i dati ottenuti con FA e quelli con RD e λ_1 ed una congruenza di entrambi con i dati presenti in letteratura.

CONCLUSIONI

In conclusione questo lavoro, condotto su un ampio campione di soggetti, mostra una valutazione globale negli stessi individui del danno tissutale che si verifica in tre momenti, più o meno critici, dell'evoluzione ad AD: il DSM, l'MCI amnesico e la piena, seppur iniziale, demenza.

I risultati presentati sono soltanto preliminari e parziali, derivando dalla prima analisi – di correlazione tra dati strutturali e neuropsicologici su un campione ampio indicativo del *continuum* del deficit mnesico - di un approfondito studio prospettico, al termine del quale un più preciso inquadramento nosologico dei pazienti con deficit di memoria iniziale permetterà anche un'analisi tra gruppi.

I pattern di correlazione tra misure neuropsicologiche, dati regionali di atrofia della sostanza grigia e di coinvolgimento microscopico della sostanza bianca sono in accordo con le attuali conoscenze sulla progressione della patologia dell'AD, che include meccanismi di atrofia cerebrale regionale, degenerazione Walleriana e disconnessione cerebrale. Inoltre, la concomitante valutazione del danno della sostanza grigia e della sostanza bianca nello stesso gruppo di soggetti fornisce spunti interessanti sulla relazione tra localizzazioni di danno cerebrale tissutale e deficit cognitivo in AD, come suggerito dalle associazioni tra dati RM e valutazione neuropsicologica.

Al di là dell'interesse verso la AD, queste misure possono fornire informazioni relative alla natura delle alterazioni dei network neuronali in altre patologie neurodegenerative e sono di potenziale rilievo anche per lo studio dell'invecchiamento fisiologico. Relativamente all'AD, tali risultati confermano la selettiva vulnerabilità ai processi neurodegenerativi del network limbico-diencefalico. La comprensione di cosa renda questi neuroni preferenzialmente suscettibili alla degenerazione è una questione chiave per le ricerche future e la identificazione delle differenze tra tale network neuronale ed

altri meno selettivamente colpiti dalla patologia potrebbe fornire un punto di partenza per una conoscenza più profonda degli aspetti patogenetici della malattia.

BIBLIOGRAFIA

Abdulrab K, Heun R. Subjective Memory Impairment. A review of its definitions indicates the need for a comprehensive set of standardised and validated criteria. *Eur Psychiatry* 2008;23(5):321-30.

Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pengas G, Nestor PJ. Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Brain* 2009 13.

Amici S, Brambati SM, Wilkins DP, Ogar J, Dronkers NL, Miller BL, Gorno-Tempini ML. Anatomical correlates of sentence comprehension and verbal working memory in neurodegenerative disease. *Journal of Neuroscience* 2007;27:6282–6290.

Andersson JLR, Jenkinson M, Smith S. Non-linear optimisation. FMRIB technical report TR07JA1 from www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep 2007a.

Andersson JLR, Jenkinson M, Smith S. Non-linear registration, aka Spatial normalisation FMRIB technical report TR07JA2 from www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep 2007b.

Apostolova LG, Dinov ID, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM. 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain*. 2006;129(Pt 11):2867-73.

Ashburner J, Friston K. Voxel-based morphometry - The methods. *NeuroImage* 2000;11:805-821.

Baddeley A, Della Scala S, Papagno C, Spinnler H, Dual task performance in dysexecutive and nondysexecutive patients with a frontal lesion. *Neuropsychology* 1997;11:187-194.

Ball MJ. Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. A quantitative study. *Acta Neuropathol.* 1978 24;42(2):73-80.

Barbeau EJ, Ranjeva JP, Didic M, Confort-Gouny S, Felician O, Soulier E, Cozzone PJ, Ceccaldi M, Poncet M. Profile of memory impairment and gray matter loss in amnesic mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* 2008;46:1009–1019.

Baron JC, Chételat G, Desgranges B, Perchev G, Landeau B, de la Sayette V, Eustache F. In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *NeuroImage* 2001;14:298-309.

Bartzokis G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 2004;25(1):5-18; author reply 49-62. Review.

Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B.* 1996;111(3):209-19.

Basser PJ. Inferring microstructural features and the physiological state of tissues from diffusion-weighted images. *NMR Biomed.* 1995;8(7-8):333-44.

Bell-McGinty S, Lopez OL, Meltzer CC, Scanlon JM, Whyte EM, Dekosky ST, Becker JT. Differential cortical atrophy in subgroups of mild cognitive impairment. *Archives of Neurology.* 2005;62(9):1393-7.

Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal N T, Shah RC & Wilson RS Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 2006;66: 1837–1844.

Berlingeri M, Bottini G, Basilico S, Silani G, Zanardi G, Sberna M, Colombo N, Sterzi R, Scialfa G, Paulesu E. Anatomy of the episodic buffer: a voxel-based morphometry study in patients with dementia. *Behav Neurol* 2008;19 :29–34.

Bozzali M, Franceschi M, Falini A, Pontesilli S, Cercignani M, Magnani G, Scotti G, Comi G, Filippi M Quantification of tissue damage in AD using diffusion tensor and magnetization transfer MRI. *Neurology* 2001; 57, 1135-1137.

Bozzali M, Falini A, Franceschi M, et al. White matter damage in Alzheimer's disease assessed in vivo using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psichiatriy* 2002; 72:742-746.

Bozzali M, Filippi M, Magnani G, Cercignani M, Franceschi M, Schiatti E, Castiglioni S, Mossini R, Falautano M, Scotti G, Comi G, Falini A. The contribution of voxel-based morphometry in staging patients with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2006 8;67(3):453-60.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 1991;82:239-259.

Bracco L, Amaducci L, Pedone D, Bino G, Lazzaro MP, Carella F, D'Antona R, Gallato R, Denes G. Italian Multicentre Study on Dementia (SMID): a neuropsychological test battery for assessing Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 1990;24:213-226.

Bracco L, Giovannelli F, Bessi V, Borgheresi A, Di Tullio A, Sorbi S, Zaccara G, Cincotta M. Mild cognitive impairment: loss of linguistic task-induced changes in motor cortex excitability. *Neurology*. 2009 ;72(10):928-34.

Brun A, Englund E. A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol*. 1986 ;19(3):253-62.

Cabeza R, Ciaramelli E, Olson IR, Moscovitch M. The parietal cortex and episodic memory: an attentional account. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:613-25.

Callen DJ, Black SE, Gao F, Caldwell CB, Szalai JP. Beyond the hippocampus: MRI volumetry confirms widespread limbic atrophy in AD. *Neurology*. 2001 13;57(9):1669-74.

Cavanna AE, Trimble MR. The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain*. 2006;129(Pt 3):564-83. Review.

Chételat G, Desgranges B, de la Sayette V, Viader F, Berkouk K, Landeau B, Lalevée C, Le Doze F, Dupuy B, Hannequin D, Baron JC, Eustache F. Dissociating atrophy and hypometabolism impact on episodic memory in mild cognitive impairment. *Brain* 2003;126:1955–1967.

Chételat G, Desgranges B, De La Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC. Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. *Neuroreport* 2002;13:1939-1943.

Chételat G, Desgranges B, Landeau B, Mézenge F, Poline JB, de la Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC. Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease. *Brain* 2008;131, 60-71.

Chételat G, Landeau B, Eustache F, Mézenge F, Viader F, de la Sayette V, Desgranges B, Baron JC. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *NeuroImage* 2005;27:934-946.

Choi SJ, Lim KO, Monteiro I, et al. Diffusion tensor imaging of frontal white matter microstructure in early Alzheimer's disease: a preliminary study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2005; 18:12-19.

Choo IH, Lee DY, Oh JS, Lee JS, Lee DS, Song IC, Youn JC, Kim SG, Kim KW, Jhoo JH, Woo JI. Posterior cingulate cortex atrophy and regional cingulum disruption in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2008 15;16(14):4491-500.

Chua TC, Wen W, Slavin MJ, Sachdev PS. Diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a review. *Curr Opin Neurol*. 2008;21(1):83-92.

Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(11):889-98. Review.

Colombo L, Brivio C, Sartori G. Stima del quoziente intellettivo tramite l'applicazione del TIB (Test Breve di Intelligenza). *Giornale Italiano di Psicologia* 2002;vol 3: 613-638.

Damoiseaux JS, Smith SM, Witter MP, Arigita EJ, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Zarei M, Rombouts SA White matter tract integrity in aging and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp* 2008; 30:1051-1059.

Delbeuck X, Van der Linden M, Collette F. Alzheimer's disease as a disconnection syndrome? *Neuropsychol Rev* 2003;13:79-92.

Di Paola M, Macaluso E, Carlesimo GA, Tomaiuolo F, Worsley KJ, Fadda L, Caltagirone C. Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study. *Journal of Neurology* 2007;254:774–781.

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Ed. Washington: The American Psychiatric Association 1994.

Dik MG, Jonker C, Comijs HC, Bouter LM, Twisk WR, van Kamp GJ, Deeg DJH. Memory complaints and APO E-4 accelerate cognitive decline in cognitively normal elderly. *Neurology* 2001;57:2217-2222.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurology.* 2007;6(8):734-46. Review.

Elfgrén C, Gustafson L, Vestberg SJ, Rosen I, Ryding E, Passant U. Subjective experience of Memory Deficits Related to clinical and Neuroimaging Findings. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorder* 2003;16:84-92.

Englund E, Brun A, Alling C. White matter changes in dementia of Alzheimer's type. Biochemical and neuropathological correlates. *Brain*. 1988;111 (Pt 6):1425-39.

Englund E, Brun A. White matter changes in dementia of Alzheimer's type: the difference in vulnerability between cell compartments. *Histopathology*. 1990;16(5):433-9.

Eustache F, Piolino P, Giffard B, Viader F, De La Sayette V, Baron J-C, et al. "In the course of time": a PET study of the cerebral substrates of autobiographical amnesia in Alzheimer's disease. *Brain* 2004; 127: 1549–60

Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJNR Am J Neuroradiol* 1987;149:351-356.

Fjell AM, Walhovd KB, Amlie I, Bjørnerud A, Reinvang I, Gjerstad L, Cappelen T, Willoch F, Due-Tønnessen P, Grambaite R, Skinningsrud A, Stenset V, Fladby T. Morphometric changes in the episodic memory network and tau pathologic features correlate with memory performance in patients with mild cognitive impairment. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29(6):1183-9.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-198.

Fratiglioni L., Grut M., Forsell Y., Viitanen M., Grafström M., Holmén K., Ericsson K., Bäckman L., Ahlbom A., Winblad B. (1991) Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: relationship with age, sex and education. *Neurology*, 41: 1886-1892.

Frisoni GB, Testa C, Zorzan A, Sabbatoli F, Beltramello A, Soininen H, Laakso MP. Detection of grey matter loss in mild Alzheimer's disease with voxel based morphometry. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 2002;73(6):657-64.

Friston K., Frith C.D., Liddle P.F., Frackowiak R.S.J. Plastic transformation of PET images. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1991;15:634-639.

Galton C.J., Patterson K., Xuereb J., Hodges J.R. Atypical and typical presentation of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases. *Brain* 2000, 123:484-498

Ganguli M, Dodge HH, Shen C, DeKosky ST. Mild cognitive impairment, amnesic type: an epidemiologic study. *Neurology*. 2004 13;63(1):115-21.

Ge Y, Grossman RI, Babb JS, Rabin ML, Mannon LJ, Kolson DL. Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23:1327-1333.

Gianaros PJ, Greer PJ, Ryan CM, Jennings JR. Higher blood pressure predicts lower regional grey matter volume: consequences on short-term information processing. *NeuroImage* 2006;31 :754–765.

Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 1996 15;16(14):4491-500

Good C, Johnsrude I, Ashburner J, Henson R, Friston K, Frackowiak R. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *NeuroImage* 2001;14:21-36.

Guarach J Marcos T, Salamero Int J Geriatr Psychiatry Neuropsychological markers of dementia in patients with memory complaints Int J Geriatr Psychiatry 2004;19:352-358

Gündel H, O'Connor MF, Littrell L, Fort C, Lane RD. Functional neuroanatomy of grief: an fMRI study. *Am J Psychiatry*. 2003 ;160(11):1946-53.

Hämäläinen A, Pihlajamäki M, Tanila H, Hänninen T, Niskanen E, Tervo S, Karjalainen PA, Vanninen RL, Soininen H. Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging* 2007;28:1889–1903.

Head D, Buckner RL, Shimony JS, et al. Differential vulnerability of anterior white matter in nondemented aging with minimal acceleration in dementia of the Alzheimer type: evidence from diffusion tensor imaging. *Cerebral Cortex* 2004; 14:410–423.

Huang J, Friedland RP, Auchus AP. Diffusion tensor imaging of normal-appearing white matter in mild cognitive impairment and early Alzheimer disease: preliminary evidence of axonal degeneration in the temporal lobe. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(10):1943-8. 2007 28.

Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Damasio A.R. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* 1990 40: 1721-30.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984 14;225(4667):1168-70.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1986;20(4):472-81.

Jack CR Jr, Shiung MM, Gunter JL, O'Brien PC, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Cha RH, Tangalos EG, Petersen RC. Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD. *Neurology*. 2004 24;62(4):591-600.

Jack CR, Peterson RC, Xu YC, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Waring SC, Tangalos EG, Kokmen E. Prediction of AD with MRI- based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology* 1999;52:1397-1403.

Jenkinson M, Bannister PR, Brady JM, Smith SM. Improved optimisation for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *NeuroImage* 2002;17:825-841.

Jenkinson M, Smith SM. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis* 2001;5:143-156.

Jessen F, Feyen L, Freymann K, Tepest R, Maier W and Heun R et al., Volume reduction of the entorhinal cortex in subjective memory impairment, *Neurobiology of Aging* (2006); 27:1751–1756.

Jonker C, Geerlings M, Schmand B. Are memory complaints predictive for dementia? A review of clinical and population based studies. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000;15:983-991.

Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schijndel RA, Fox NC, Barkhof F. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage* 2004;23:708-716.

Kretschmann HJ, Weinrich W *Cranial Neuroimaging and Clinical Neuroanatomy Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography* 2004, 3rd edition, Thieme

Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, Jolesz F, Tanzi R, Jones K, Albert MS. MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* 2002;58:1188-1196.

Kim MS, Cave KR. Top-down and bottom-up attentional control: on the nature of interference from a salient distractor. *Percept Psychophys.* 1999;61(6):1009-23.

Kinkingnéhun S, Sarazin M, Lehericy S, Guichart-Gomez E, Hergueta T, Dubois B. VBM anticipates the rate of progression of Alzheimer disease: a 3-year longitudinal study. *Neurology*. 2008 3;70(23):2201-11.

Kinney HC, Brody BA, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. II. Patterns of myelination in autopsied infants. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1988;47(3):217-34.

Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clin Proc* 2003;78:1290-308.

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MMB, Copeland JRM, Dartigues J-F, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 2000;54(11 Suppl 5):S4-9.

Luerding R, Weigand T, Bogdahn U, Schmidt-Wilcke T. Working memory performance is correlated with local brain morphology in the medial frontal and anterior cingulate cortex in fibromyalgia patients: structural correlates of pain-cognition interaction. *Brain* 131:3222–3231.

Mascalchi M, Tessa C, Moretti M, Della Nave R, Boddi V, Martini S, Inzitari D, Villari N. Whole brain apparent diffusion coefficient histogram: a new tool for evaluation of leukoaraiosis. *J Magn Reson Imaging* 2002;15:144-148.

Matsuda H, Kitayama N, Ohnishi T, Asada T, Nakano S, Sakamoto S, Imabayashi E, Katoh A. Longitudinal evaluation of both morphologic and functional changes in the same individuals with Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 2002;43:304-311.

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 the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.

Medina D, deToledo-Morell L, Urresta F, et al. White matter changes in mild cognitive impairment and AD: a diffusion tensor imaging study. *Neurobiology of Aging* 2006; 27:663-672.

Minoschima S., Giordan B., Berent S., Frey K.A., Foster N.L., Kuhl D.E. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals neurology* 1997; 42: 85-94.

Mirra S.S., Heyman A., McKeel D. The consortium to establish a registry in Alzheimer's disease (CERAD). Part II: Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41:479-486.

Modrego PJ, Fayed N, Pina MA. Conversion from mild cognitive impairment to probable Alzheimer's disease predicted by brain magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 2005;162(4):667-75.

Moseley M. Diffusion tensor imaging and aging - a review. *NMR Biomed*. 2002 15(7-8):553-60. Review.

Nestor PJ, Fryer TD, Smielewski P, Hodges JR. Limbic hypometabolism in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2003;54:343-351.

Nichols TE e Holmes AP. Nonparametric Permutation Tests for Functional Neuroimaging: A Primer with Examples. *Human Brain Mapping* 2002;15:1-25.

Nobre AC, Sebestyen GN, Gitelman DR, Mesulam MM, Frackowiak RS, Frith CD. Functional localization of the system for visuospatial attention using positron emission tomography. *Brain*. 1997; 120 (Pt 3):515-33.

Novelli G, Papagno C, Capitani E. Tre test clinici di ricerca e produzione lessicale: taratura su soggetti normali. *Arch Psycho*1986;47:477-506.

Pengas G, Hodges JR, Watson P, Nestor PJ. Focal posterior cingulate atrophy in incipient Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2010;31(1):25-33.

Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Hallikainen M, Vanhanen M, Hippocampus and enthorinel cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiology of Aging* 2004;25:303-310.

Perry RJ, Hodges JR. Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain*. 1999;122 (Pt 3):383-404. Review.

Perry RJ, Watson P, Hodges JR, The Nature and staging of attention dysfunction in early (minimal and mild) Alzheimer's disease: relationship to episodic and semantic memory impairment. *Neuropsychologia* 2000;38:252-271.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. *Archives of Neurology* 2001;58:1985-1992.

Petersen RC, Smith GE, Waring S, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology* 1999;56:303-308.

Pfefferbaum A, Sullivan EV, Hedehus M, Lim KO, Adalsteinsson E, Moseley M. Age-related decline in brain white matter anisotropy measured with spatially corrected echo-planar diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med*. 2000;44(2):259-68.

Poppenk J, Moscovitch M, McIntosh AR, Ozelik E, Craik FI. Encoding the future: successful processing of intentions engages predictive brain networks. *Neuroimage*. 2010;49(1):905-13.

Reid LM, MacLulich AMJ: Subjective memory complaints and cognitive impairment in older people. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorder* 2006; 22: 471–485.

Reisberg B, Franssen EH, Hasan SM, Monteiro I, Boksay I, Souren LE, Kenowsky S, Auer SR, Elahi S, Kluger A. Retrogenesis: clinical, physiologic, and pathologic

mechanisms in brain aging, Alzheimer's and other dementing processes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249 Suppl 3:28-36. Review.

Reitan RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Perceptual and Motor Skill* 1958;8:271-276.

Rey A. *L'Examen Clinique en Psychologie.* Presse Universitaire de France, Paris 1964.

Rombouts SA, Barkhof F, Witter MP, Scheltens P. Unbiased whole-brain analysis of gray matter loss in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2000;285:231-233.

Rose, SE, Chalk, JB, Janke, AL, Strudwick, MW, Windus, LC, Hannah, DE, McGrath, JJ, Pantelis, C, Wood, SJ, Mowry, BJ Evidence of altered prefrontal-thalamic circuitry in schizophrenia: an optimized diffusion MRI study. *Neuroimage* 2006; 32, 16–22.

Rossini PM, Rossi S, Babiloni C, Polich J. Clinical neurophysiology of aging brain: From normal aging to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 2007;83:375-400.

Rueckert D, Sonoda LI, Hayes C, Hill DLG, Leach MO, Hawkes DJ. Non-rigid registration using free-form deformations: Application to breast MR images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 1999;18:712-721.

Rüsch N, Spoletini I, Wilke M, Bria P, Di Paola M, Di Iulio F, Martinotti G, Caltagirone C, Spalletta G. Prefrontal–thalamic–cerebellar gray matter networks and executive functioning in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;93:79–89.

Salat DH, Tuch DS, van der Kouwe AJ, Greve DN, Pappu V, Lee SY, Hevelone ND, Zaleta AK, Growdon JH, Corkin S, Fischl B, Rosas HD. White matter pathology isolates the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 2010;31(2):244-56.

Sartori G, Colombo L, Vallar G, Rusconi ML, Pinarello A. T.I.B. Test di intelligenza breve per la valutazione del quoziente intellettivo attuale e pre-morboso. Professione di Psicologo. Giornale dell'Ordine degli Psicologi 1995;vol 4.

Schmahmann JD, Pandya DN. The complex history of the fronto-occipital fasciculus. *J Hist Neurosci.* 2007;16(4):362-77.

Schmidt-Wilcke T, Poljansky S, Hierlmeier S, Hausner J, Ibach B. Memory performance correlates with gray matter density in the ento-/perirhinal cortex and posterior hippocampus in patients with mild cognitive impairment and healthy controls-- a voxel based morphometry study. *NeuroImage* 2009;47:1914-1920.

Schofield P, Marder K, Dooneief G, Jacobs D, Sano M, Stern Y, Association of Subject memory complaints with Subsequent Cognitive Decline in Community Dwelling Elderly individuals. *Am J Psychiatry* 1997;154:609-614.

Selden NR, Gitelman DR, Salamon-Murayama N, Parrish TB, Mesulam MM. Trajectories of cholinergic pathways within the cerebral hemispheres of the human brain. *Brain.* 1998;121 (Pt 12):2249-57.

Serra L, Cercignani M, Lenzi D, Perri R, Fadda L, Caltagirone C, Macaluso E, Bozzali M. Grey and white matter changes at different stages of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):147-59.

Shiino A, Watanabe T, Maeda K, Kotani E, Akiguchi I, Matsuda M. Four subgroups of Alzheimer's disease based on patterns of atrophy using VBM and a unique pattern for early onset disease. *Neuroimage.* 2006 15;33(1):17-26

Sjöbeck M, Haglund M, Englund E. White matter mapping in Alzheimer's disease: A neuropathological study. *Neurobiology of Aging.* 2006;27(5):673-80.

Smith CD, Chebrolu H, Wekstein DR, Schmitt FA, Markesbery WR. Age and gender effects on human brain anatomy: a voxel-based morphometric study in healthy elderly. *Neurobiology of Aging* 2007;28:1075-1087.

Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, Watkins KE, Ciccarelli O, Cader MZ, Matthews PM, Behrens TE, 2006. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage* 2006;31:1487-1505.

Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, Watkins KE, Ciccarelli O, Cader MZ, Matthews PM, Behrens TE. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage*. 2006 15;31(4):1487-505.

Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, FlitneyDE, Niazy R, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, BradyJM, Matthews PM. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* 2004;23:208-219.

Smith SM, Johansen-Berg H, Jenkinson M, Rueckert D, Nichols TE, Miller KL, Robson MD, Jones DK, Klein JC, Bartsch AJ, Behrens TE. Acquisition and voxelwise analysis of multi-subject diffusion data with tract-based spatial statistics. *Nat Protoc*. 2007;2(3):499-503.

Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping* 2002;17:143-155.

Smith, 2007 C.D. Smith, Mild cognitive impairment is too late: the case for presymptomatic detection and treatment of Alzheimer's disease, *Cogn. Sci.* 2007;. 127–177

Song AW, Harshbarger T, Li T, Kim KH, Ugurbil K, Mori S, Kim DS. Functional activation using apparent diffusion coefficient-dependent contrast allows better spatial localization to the neuronal activity: evidence using diffusion tensor imaging and fiber tracking. *Neuroimage*. 2003;20(2):955-61.

Song SK, Sun SW, Ramsbottom MJ, Chang C, Russell J, Cross AH. Demyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage*. 2002;17(3):1429-36.

Squire L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and human [Review]. *Psychol. Rev.* 1992, 99:195-231.

Stroop J. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of experimental psychology* 1935;18:643-662

Stricker NH, Schweinsburg BC, Delano-Wood L, Wierenga CE, Bangen KJ, Haaland KY, Frank LR, Salmon DP, Bondi MW. Decreased white matter integrity in late-myelinating fiber pathways in Alzheimer's disease supports retrogenesis. *Neuroimage*. 2009;45(1):10-6.

Sullivan EV, Pfefferbaum A. Diffusion tensor imaging and aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(6):749-61. 2006 1. Review.

Takahashi S, Yonezawa H, Takahashi J, et al. Selective reduction of diffusion anisotropy in white matter of Alzheimer disease brains measured by 3.0 Tesla magnetic resonance imaging. *Neurosci Lett* 2002; 332:45–48

Taoka T, Iwasaki S, Sakamoto M, Nakagawa H, Fukusumi A, Myochin K, Hirohashi S, Hoshida T, Kichikawa K. Diffusion anisotropy and diffusivity of white matter tracts within the temporal stem in Alzheimer disease: evaluation of the "tract of interest" by diffusion tensor tractography. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27(5):1040-5.

Teipel SJ, Meindl T, Grinberg L, Heinsen H, Hampel H. Novel MRI techniques in the assessment of dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35 Suppl 1:S58-69. Review.

Thomann PA, Toro P, Dos Santos V, Essig M, Schröder J. Clock drawing performance and brain morphology in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Cogn* 2008;67:88-93.

Thomas C, Moya L, Avidan G, Humphreys K, Jung KJ, Peterson MA, Behrmann M. Reduction in white matter connectivity, revealed by diffusion tensor imaging, may account for age-related changes in face perception. *J Cogn Neurosci* 2008 20, 268-284.

Tulving E, Kapur S, Markowitsch HJ, Craik FI, Habib R, Houle S. Neuroanatomical correlates of retrieval in episodic memory: auditory sentence recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2012-5.

van der Flier M, van Buchem MA, Weverling-Rijnsburger AW, Mutsaers ER, Bollen EL and Admiraal-Behloul F et al., Memory complaints in patients with normal cognition are associated with smaller hippocampal volumes, *J Neurol* (2004);6:671–675.

Wagner AD, Shannon BJ, Kahn I, Buckner RL. Parietal lobe contributions to episodic memory retrieval. *Trends Cogn Sci*. 2005 ;9(9):445-53. Review.

Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher LM, van Zijl PC, Mori S. Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology*. 2004;230(1):77-87. 2003

Wang L, Swank JS, Glick IE, et al. Changes in hippocampal volume and shape across time distinguish dementia of the Alzheimer type from healthy aging. *Neuroimage* 2003; 20:667-682.

Wilson BA, Cockburn J, Baddeley A Hiorns R. The development and validation of a test battery for detecting and monitoring everyday memory problems. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 1989;11:855-870.

Xie S, Xiao JX, Gong GL, Zang YF, Wang YH, Wu HK, Jiang XX. Voxel-based detection of white matter abnormalities in mild Alzheimer disease. *Neurology*. 2006 27;66(12):1845-9.

Zhang Y, Brady M, Smith SM. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation maximization algorithm. *IEEE Trans on Medical Imaging* 2001;20:45-57.

Zhang Y, Schuff N, Jahng GH, et al. Diffusion tensor imaging of cingulum fibers in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurology* 2007; 68:13–19

Tab. 1 *Caratteristiche clinico-demografiche e neuropsicologiche* della popolazione in studio.*

	Controlli (n=15)	DSM (n=35)	MCI (n=30)	AD (n=21)
Età ⁽¹⁾	69.3 ± 7.1	64.7 ± 8.9	69.2 ± 7.7	74.4 ± 6.9
Genere	9F/6M	24F/11M	18F/12M	18F/3M
Scolarità ⁽¹⁾	9.3 ± 4.1	11.7 ± 5	10.1 ± 4.7	7.5 ± 4.4
MMSE	28.9 ± 1.6	28.1 ± 1.8	26.5 ± 2.17	25.2 ± 2.7
CVI ⁽²⁾	-1.1 ± 0.3	-1.1 ± 0.2	-0.7 ± 0.3	-0.3 ± 0.4
RMBT ⁽²⁾	21.3 ± 2.0	21.0 ± 2.3	16.0 ± 4.8	5.8 ± 5.4
Breve racconto ⁽²⁾	13.5 ± 3.9	13.8 ± 4.5	8.6 ± 5.0	2.5 ± 2.7
Figura di Rey-Osterrieth (richiamo) ⁽²⁾	19.2 ± 6.6	17.9 ± 6.9	12.8 ± 5.7	3.9 ± 4.8
Test dei Gettoni ⁽³⁾	34.4 ± 0.8	34.3 ± 1.4	33.2 ± 2.5	30.9 ± 3.4
Trail Making Test B ⁽⁴⁾	91.2 ± 13.4	54.5 ± 29.5	119.4 ± 105.8	296.1 ± 179.0

* relative ai test inseriti nell'analisi di correlazione

I valori sono espressi come Media ± Deviazione Standard

ANOVA + analisi post-hoc di Bonferroni ($p < 0.05$):

⁽¹⁾ AD versus DSM

⁽²⁾ controlli versus MCI e AD, DSM versus MCI e AD, MCI versus AD

⁽³⁾ AD versus controlli, DSM e MCI

⁽⁴⁾ AD versus controlli, DSM e MCI; MCI versus AD

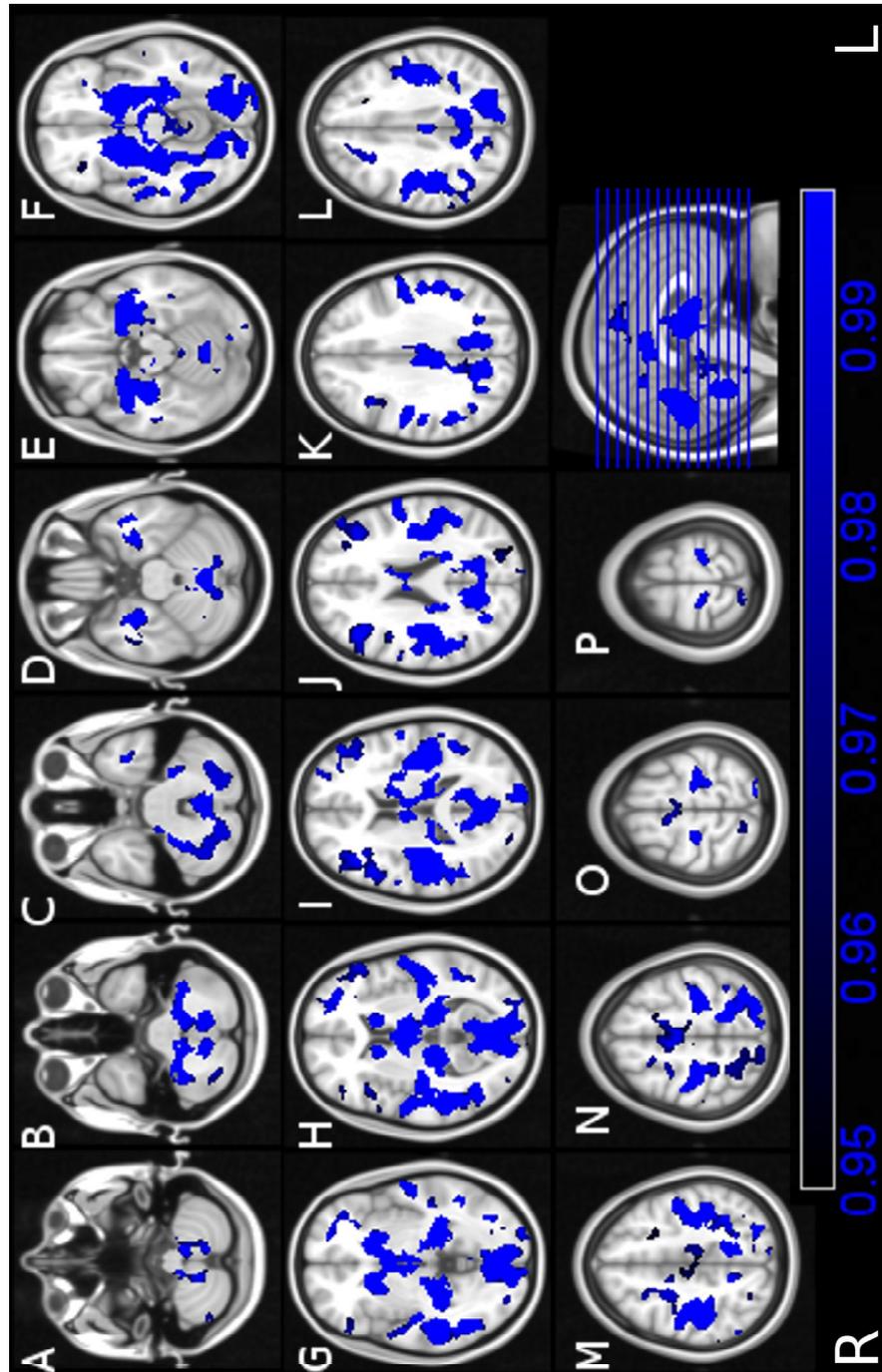


Fig. 1 Correlazioni tra volume regionale della sostanza grigia dell'encefalo ed età ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

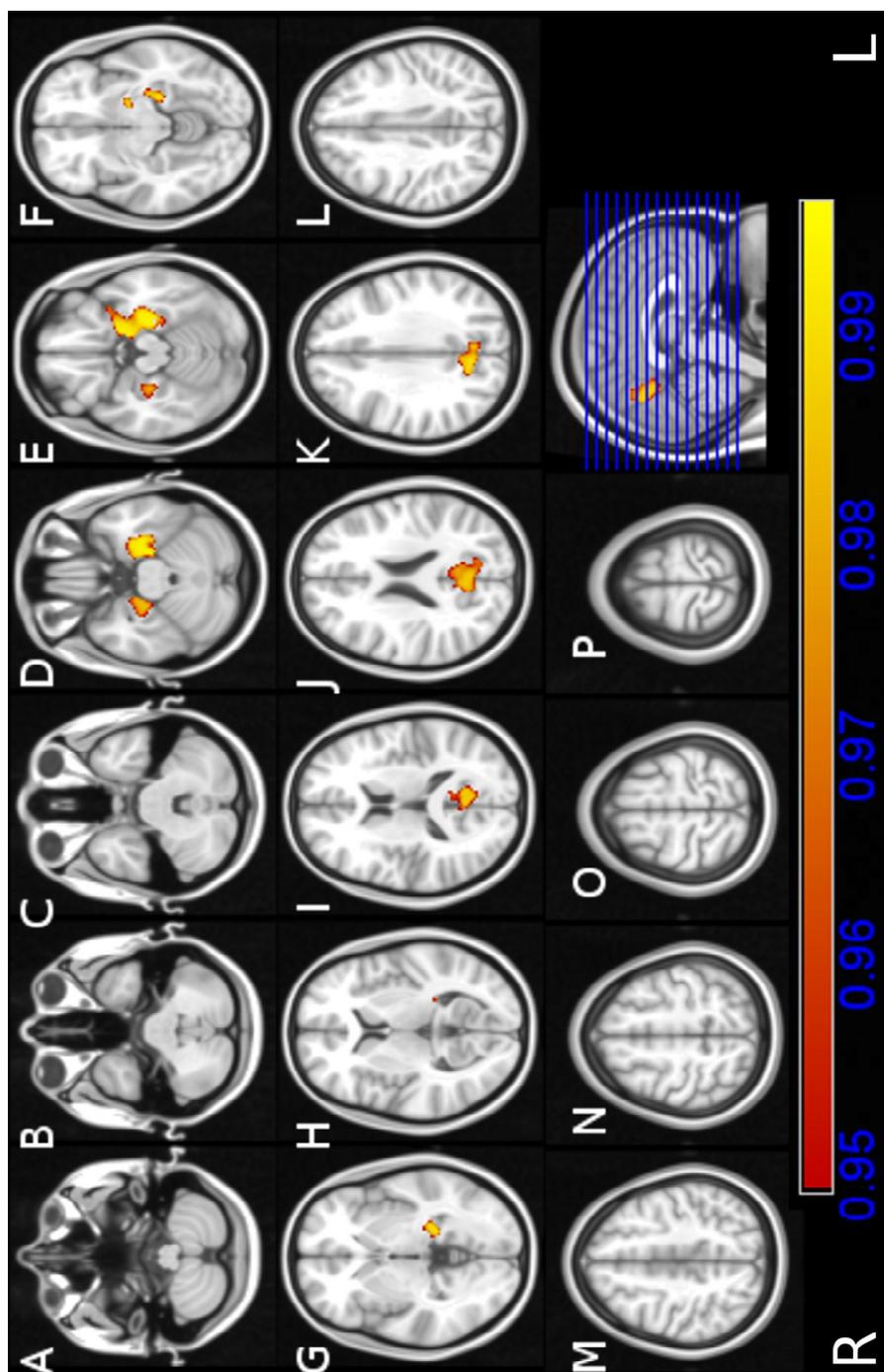


Fig. 2 Correlazioni tra volume regionale della sostanza grigia dell'encefalo e punteggio CV1 ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

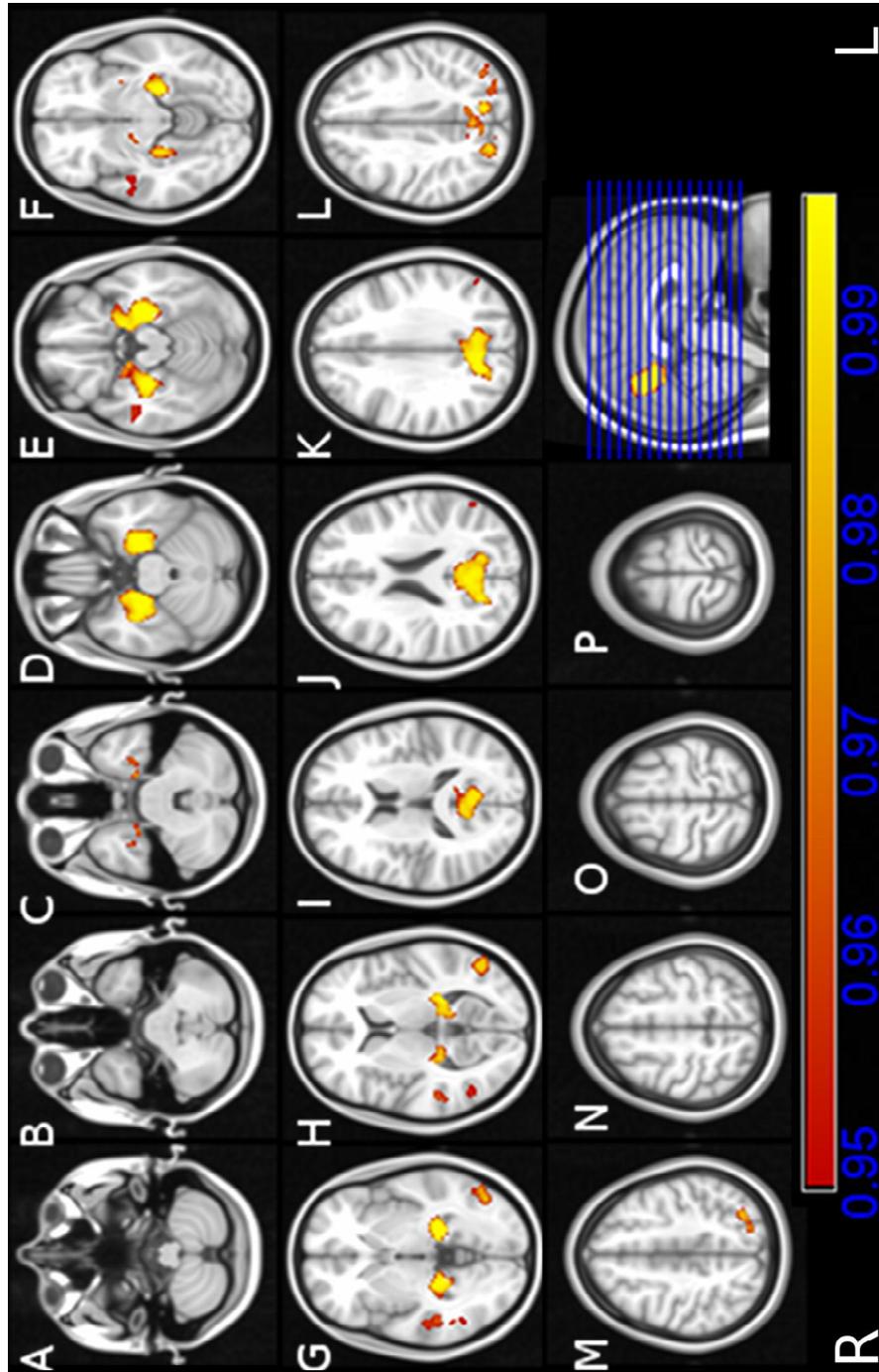


Fig. 3 Correlazioni tra volume regionale della sostanza grigia dell'encefalo e punteggio al RMBT ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

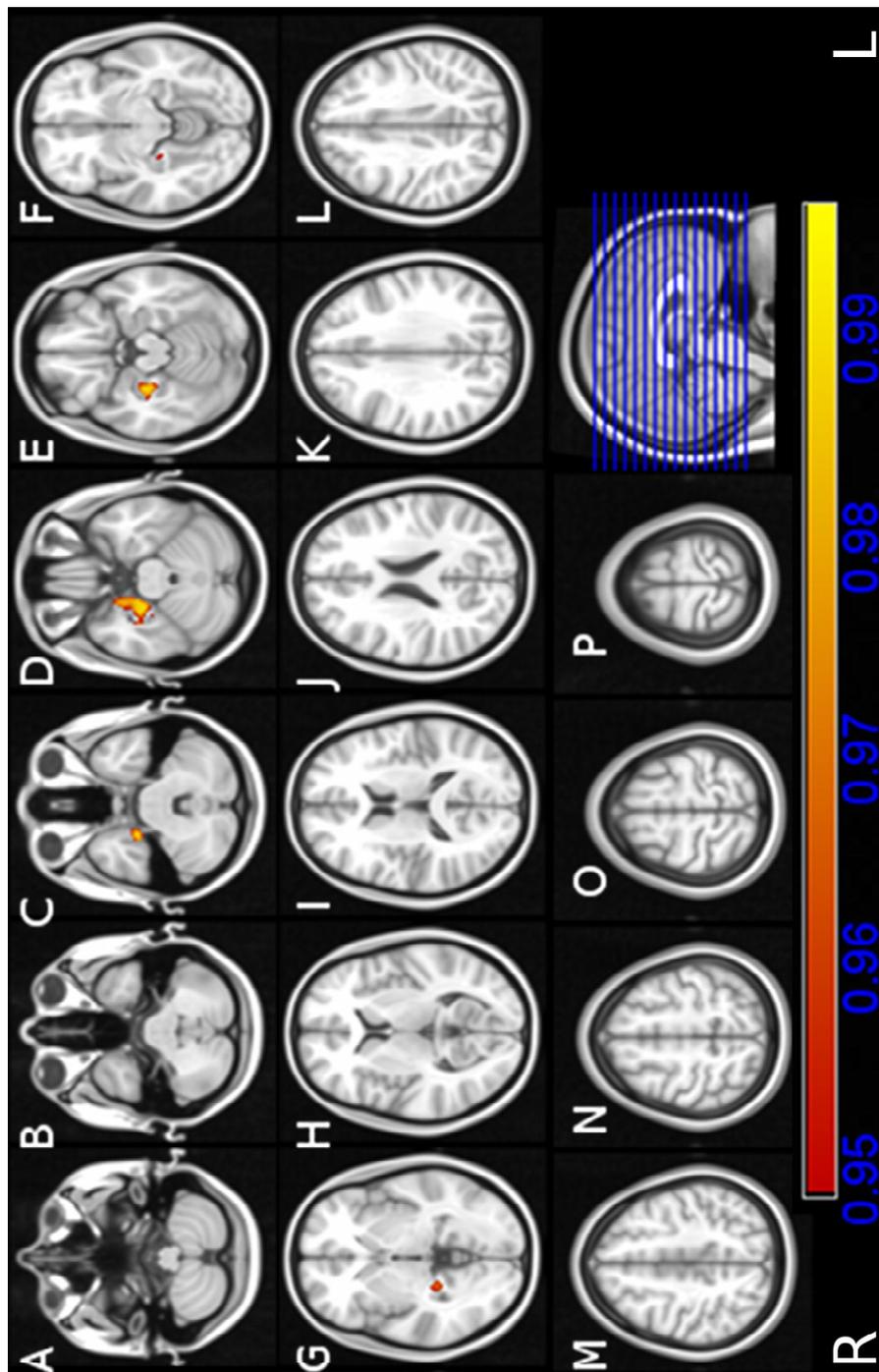


Fig. 4 Correlazioni tra volume regionale della sostanza grigia dell'encefalo e punteggio al richiamo del Breve Racconto ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

Tab. 2 *Correlazioni tra volumi regionali della sostanza grigia encefalica ed età*

<i>Numero del cluster</i>	<i>Dimensione del cluster (mm³)</i>	<i>p*</i>	<i>Coordinate (local maxima)</i>			<i>Aree anatomiche</i>
			x	y	z	
1	36955	<0.001	34	-72	-18	Estese aree di sostanza grigia corticali e sottocorticali bilaterali ; Insula e corteccia frontale basale e anteriore bilateralmente
2	1159	0.007	42	32	18	Giri frontali medio ed inferiore di destra
3	823	0.011	6	-4	54	Giro del cingolo medio e posteriore bilaterali
4	117	0.030	-20	-82	22	Precuneo e giro parietale superiore di sinistra
5	80	0.031	32	34	-8	Giro frontale inferiore destro

** corretta per confronti multipli*

La dimensione di ciascuna area è espressa in numero di voxel

Tab. 3 *Correlazioni tra volumi regionali della sostanza grigia encefalica e test neuropsicologici*

<i>Test</i>	<i>Numero del cluster</i>	<i>Dimensione del cluster</i>	<i>p</i>	<i>Coordinate (local maxima)</i>			<i>Aree anatomiche</i>
				x	y	z	
<i>CVI</i>	1	1347	0.002	-24	-18	-24	Amigdala e ippocampo di sinistra
	2	1013	0.007	8	-66	26	Precuneo bilaterale
	3	302	0.014	20	-16	-28	Corpo dell'ippocampo destro
<i>RMBT</i>	1	4207	<0.001	-24	-18	-26	Amigdala e ippocampo sinistro; precuneo, giro del cingolo posteriore, giro parietale superiore bilateralmente
	2	1605	<0.001	26	-16	-26	Amigdala e ippocampo di destra
	3	328	0.001	-50	-70	6	Giri occipitale e temporale medio di sinistra
	4	233	0.027	58	-40	2	Giro temporale medio destro
	5	144	0.038	58	-18	-14	Giro temporale medio e superiore destro
	6	58	0.043	50	-62	8	Giri occipitale e temporale medio di destra
<i>Breve Racconto</i>	1	635	0.008	24	-14	-28	Amigdala e ippocampo di destra
<i>TMT-B</i>	2	1432	0.002	22	-12	-28	Amigdala e ippocampo di destra
	2	249	0.027	28	-44	-10	Giro fusiforme destro
		204	0.020	-26	-12	-24	Amigdala destra; testa dell'ippocampo destro

* *corretta per confronti multipli*

La dimensione di ciascuna area è espressa in numero di voxel

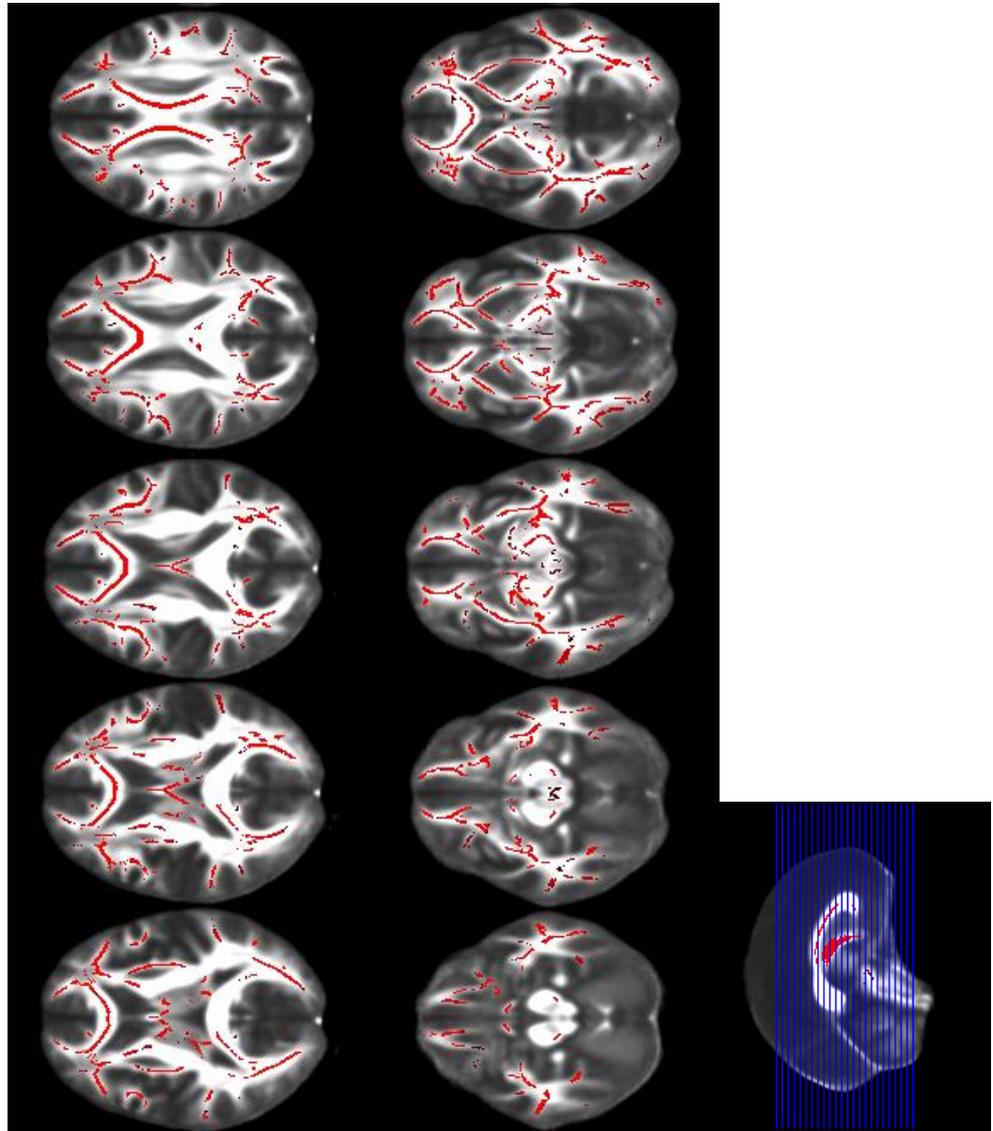


Fig. 5 Correlazioni tra FA ed età ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

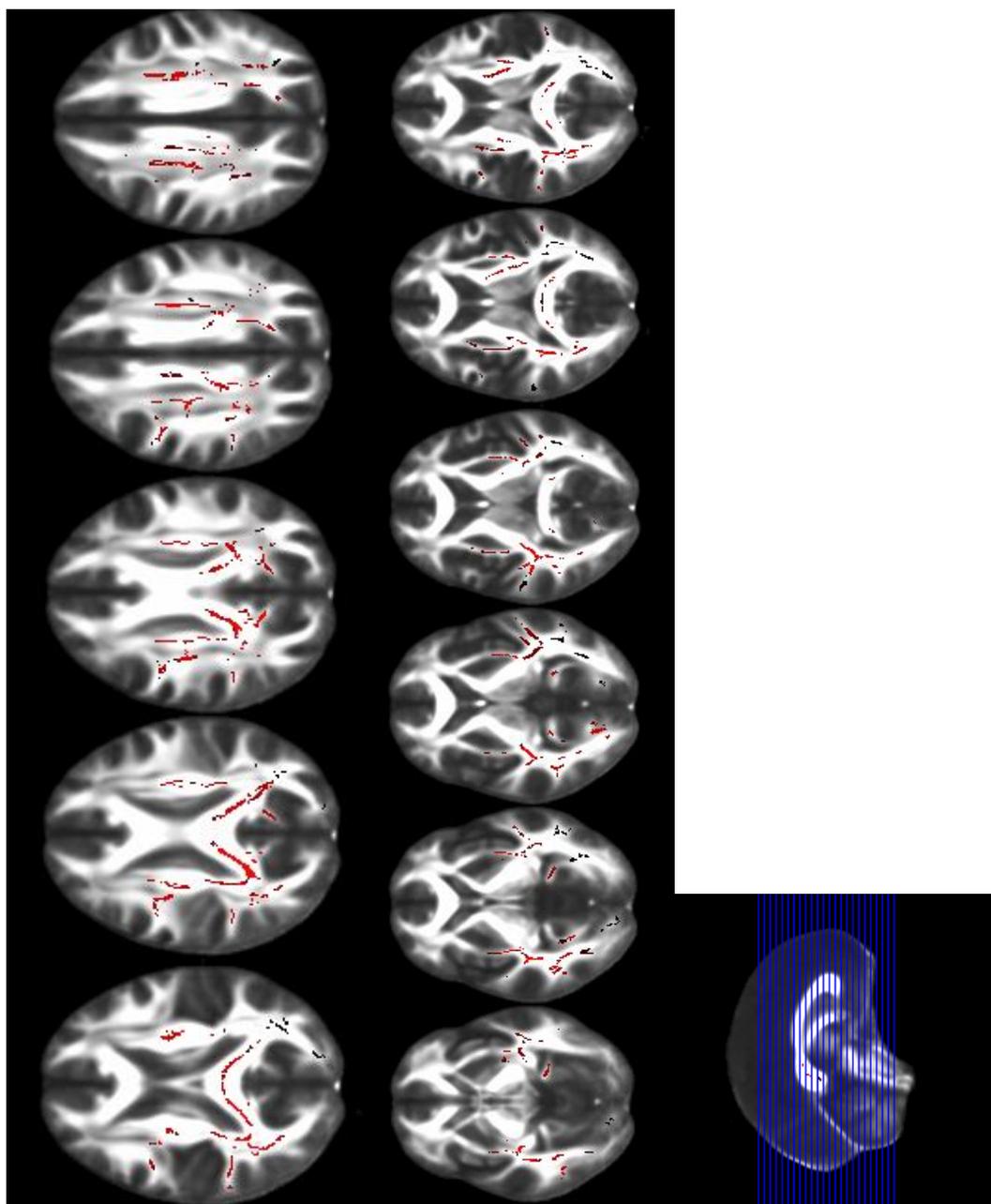


Fig. 6 Correlazioni tra FA e punteggio CVI ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli)

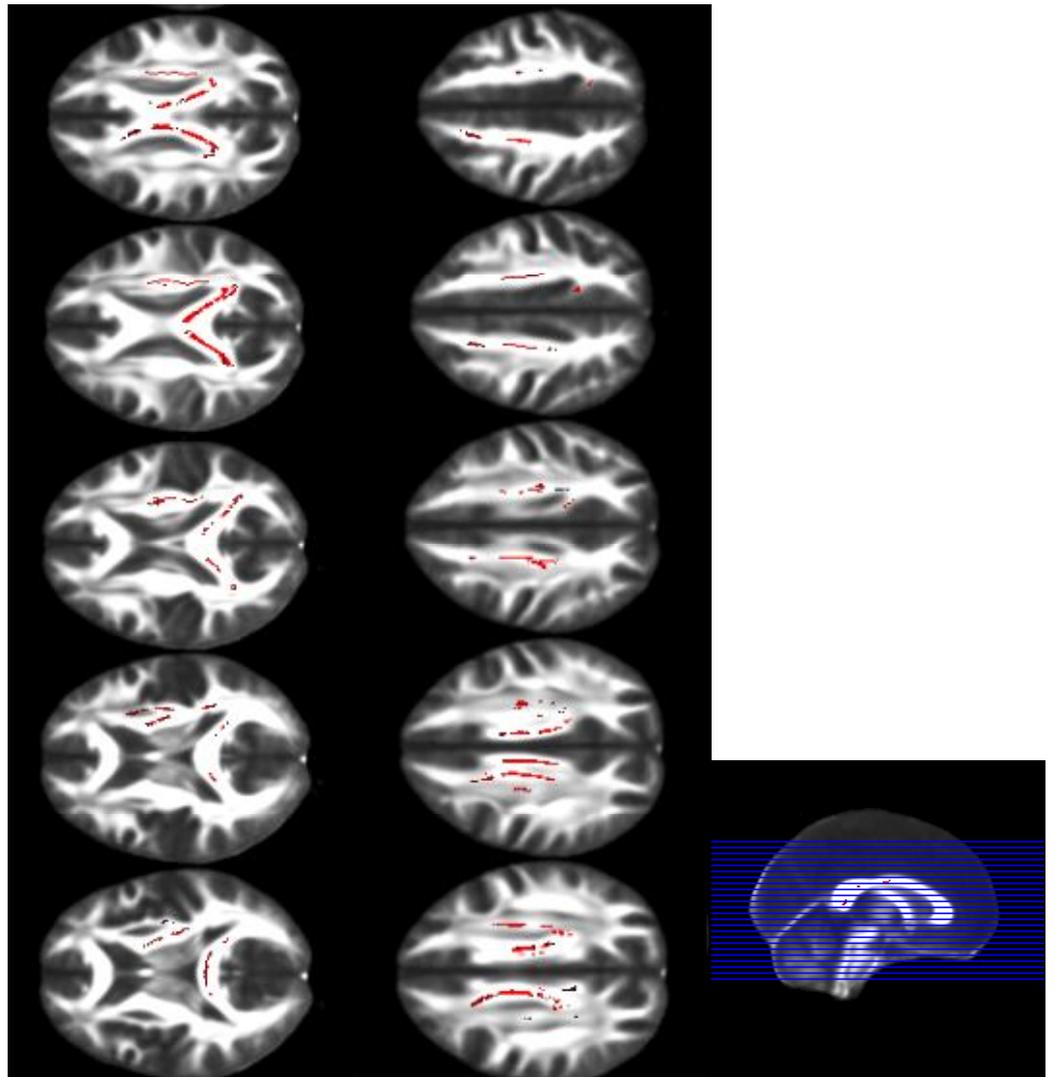


Fig. 7 Correlazioni tra FA e punteggio al richiamo della Figura Complessa di Rey-Osterrieth ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

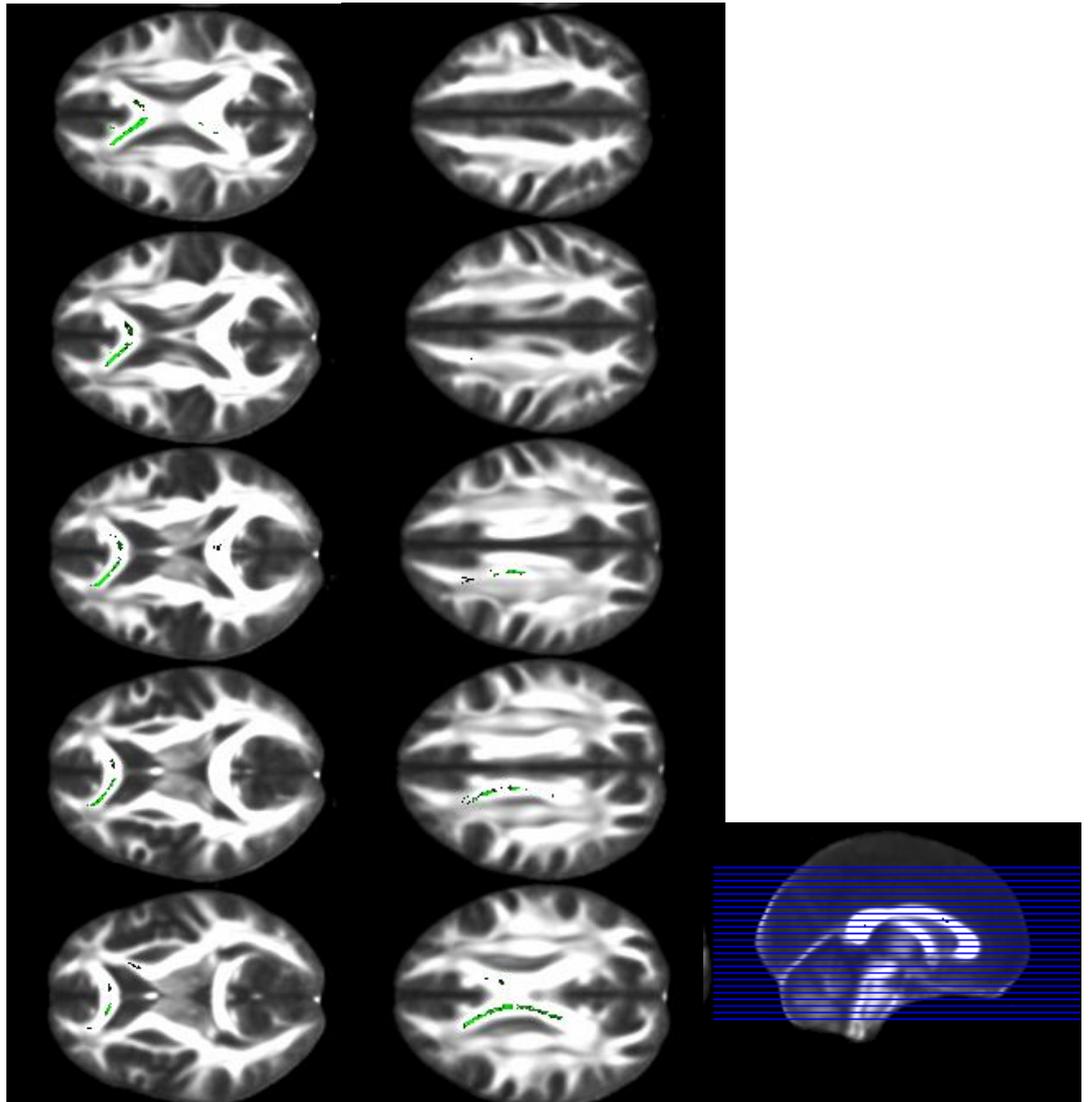


Fig. 8 Correlazioni tra λ_{11} e punteggio al richiamo de Breve Racconto ($p < 0.05$, corretta per confronti multipli).

Tab. 4 Correlazioni tra FA e test neuropsicologici

Test	Numero del cluster	Dimensione del cluster	p	Coordinate (local maxima)			Aree anatomiche
				x	y	z	
<i>CVI</i>	1	13493	0.007				Sostanza bianca bilaterale sottocorticale temporo-parietale, fascicolo longitudinale inferiore, fornice, peduncolo temporale, capsula esterna, braccio posteriore della capsula interna, corona radiata, fascicolo longitudinale superiore, corpo calloso (corpo and splenio)
	2	289	0.048	-51	-48	0	Sostanza bianca sottocorticale del giro temporale medio di sinistra
	3	267	0.047	-30	-63	12	Radiazione ottica sinistra
	4	226	0.048	-29	-59	-1	Radiazione ottica destra
	5	107	0.049	-16	-85	17	Sostanza bianca sottocorticale del lobo occipitale di sinistra
	6	78	0.050	15	-82	-6	Sostanza bianca sottocorticale del lobo occipitale di destra
	7	57	0.050	53	-24	5	Sostanza bianca sottocorticale del giro temporale superiore sinistro
	8	55	0.050	-30	-62	34	Sostanza bianca sottocorticale della porzione laterale del lobo occipitale di sinistra
<i>Figura di Rey (richiamo)</i>	1	5830	31	12	-38	21	Corpo e splenio del corpo calloso; corona radiata bilaterale; capsula esterna sinistra, braccio posteriore della capsula esterna sinistra
<i>Test dei Gettoni</i>	1	4666	25	-8	-38	17	Corpo calloso (corpo e splenio)
	2	142	46	-30	-49	33	Sostanza bianca sottocorticale del precuneo e del giro del cingolo posteriore di sinistra

Tab. 5 *Correlazioni tra RAD e test neuropsicologici*

<i>Test</i>	<i>Numero del cluster</i>	<i>Dimensione del cluster</i>	<i>p</i>	<i>Coordinate (local maxima)</i>			<i>Aree anatomiche</i>
				<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	
<i>CVI</i>	1	2526	0.040	20	-47	23	Fascicolo fronto-occipitale inferiore destro e peduncolo del temporale, corona radiata superiore (tratto cortico-spinale)
	2	610	0.044	-23	-22	38	Corona radiata superiore sinistra (tratto cortico-spinale)
<i>RMBT</i>	1	1795	0.036	21	-48	22	Fascicolo fronto-occipitale inferiore destro, corona radiata superiore, porzione posteriore del corpo del corpo calloso
	2	1338	0.046	20	-31	49	Fascicolo fronto-occipitale inferiore sinistro, corona radiata superiore, porzione posteriore del corpo del corpo calloso

Tab. 6 *Correlazioni tra $\lambda 1$ e test neuropsicologici*

<i>Test</i>	<i>Numero del cluster</i>	<i>Dimensione del cluster</i>	<i>p</i>	<i>Coordinate (local maxima)</i>			<i>Aree anatomiche</i>
				<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	
<i>Breve Racconto</i>	1	1751	0.030	16	25	22	Porzione destra del corpo e del ginocchio del corpo calloso
	2	484	0.043	-17	23	-14	Fascicolo fronto-occipitale (porzione frontale)
	3	330	0.043	-2	15	19	Porzione sinistra del corpo e del ginocchio del corpo calloso