

Politecnico di Torino
Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

**Valutazione dei network cerebrali
stimolati dalla TMS**

Relatore:

Prof. Luca Mesin

Co-Relatore:

Dott. Giorgio Tonon

Candidato:

Andrea Bolla

Dicembre 2025

*a Nonno Barba,
la guida silenziosa che porto con me.
Spero che tu possa essere
felice e orgoglioso,
anche da lassù.*

Abstract

Uno degli obiettivi fondamentali delle neuroscienze è comprendere i principi che regolano la comunicazione tra le regioni cerebrali e la loro organizzazione in reti funzionali. In questo contesto, la Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS), combinata con l'elettroencefalografia (EEG), costituisce uno strumento efficace per l'analisi della connettività funzionale tra le diverse aree corticali. In questo lavoro è stata analizzata la risposta corticale a impulsi TMS con l'obiettivo di valutare i network cerebrali coinvolti, mediante metriche di connettività nel dominio delle frequenze e tecniche di ricostruzione nello spazio sorgente, un passaggio fondamentale per ottenere risultati migliori. Lo studio ha previsto un'ampia fase sperimentale svolta in collaborazione con l'azienda GEA Soluzioni S.r.l., comprendente la raccolta dei dati EEG-TMS necessari all'analisi. Durante questa fase è stata impiegata la strumentazione dell'azienda, tra cui il sistema di acquisizione ad alta densità, uno stimolatore magnetico transcranico della famiglia MagPro e un sistema di neuronavigazione, al fine di garantire la riproducibilità e l'accuratezza delle stimolazioni. La successiva fase di elaborazione e analisi dei dati è stata condotta mediante l'utilizzo del linguaggio Python e della libreria MNE, strumenti che hanno permesso di implementare procedure di pre-processing e calcolo della connettività. I risultati principali dello studio hanno messo in luce che un aumento dell'intensità dello stimolo TMS induce un incremento significativo di alcune metriche globali e locali della rete, indipendentemente dalla banda del segnale EEG presa in esame.

Elenco delle figure

2.1	Potenziale d'Azione - PA	6
2.2	Lobi Corteccia Cerebrale	9
3.1	Ritmi del segnale EEG	14
5.1	Aree di Brodmann da " <i>The Principles of Comparative Localization in the Cerebral Cortex Based on Cytoarchitectonics - 1909</i> " [26]	23
5.2	Esperimenti di Sieji Ogawa - 1992 [29]	24
5.3	Parcellizzazione a 7 network - 2011 [52]	25
5.4	Grafo non-orientato	34
6.1	Cuffia Utilizzata - Waveguard di AntNeuro	38
6.2	Misura Real-Time delle impedenze	39
6.3	Montaggio dei 58 canali utilizzati.	40
6.4	Monitor del Neuronavigatore	41
6.5	Set-up completo.	42
6.6	Rappresentazione grezza del segnale con stimolazione intorno al quattordicesimo secondo.	43
6.7	Rappresentazione grezza del segnale con artefatto rimosso tramite interpolazione lineare.	44
6.8	Segmentazione del segnale	45
6.9	Proprietà tipiche di un movimento oculare	46
6.10	Fine Pre-Processing	46
6.11	Parcellizzazione Yeo 7 Networks: visualizzazione tridimensionale e corrispondenza cromatica dei network [52]	48
6.12	Parcellizzazione Yeo 17 Networks: visualizzazione tridimensionale e corrispondenza dei 17 network tramite codifica cromatica [52]	49
6.13	Esempio dell'estrazione delle serie temporali per i 7 network di Thomas Yeo (rappresentazione di due epoche concatenate)	50

7.1	Matrici di adiacenza per stimolazione sotto-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 7 Network	57
7.2	Matrici di adiacenza per stimolazione sopra-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 7 Network	58
7.3	Matrici di adiacenza per stimolazione sotto-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 17 Network	59
7.4	Matrici di adiacenza per stimolazione sopra-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 17 Network	60
7.5	BoxPlot delle quattro metriche in banda theta - Parcellazione Yeo 7 Network	61
7.6	BoxPlot delle quattro metriche in banda alpha - Parcellazione Yeo 7 Network	62
7.7	BoxPlot delle quattro metriche in banda beta - Parcellazione Yeo 7 Network	63
7.8	BoxPlot delle quattro metriche in banda theta - Parcellazione Yeo 17 Network	64
7.9	BoxPlot delle quattro metriche in banda alpha - Parcellazione Yeo 17 Network	65
7.10	BoxPlot delle quattro metriche in banda beta - Parcellazione Yeo 17 Network	66
7.11	Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda theta	67
7.12	Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione significative di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda theta	68
7.13	Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda alpha	69
7.14	Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione significativa di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda alpha	70
7.15	Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda beta	71

Elenco delle figure

7.16 Raffigurazione tridimensionale su <i>fsaverage</i> della variazione della forza di connessione significativa di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda beta	72
7.17 Valutazione della forza di connessione in base alle differenti tipologie di evento nel sito di stimolazione	73

Elenco delle tabelle

6.1	Valori di soglia motoria per ciascun soggetto	41
7.1	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda theta - Parcellizzazione: 7 Network. . .	75
7.2	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda alpha - Parcellizzazione: 7 Network. . .	75
7.3	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda beta - Parcellizzazione: 7 Network. . .	75
7.4	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda theta - Parcellizzazione: 17 Network. . .	76
7.5	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda alpha - Parcellizzazione: 17 Network. . .	76
7.6	Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda beta - Parcellizzazione: 17 Network. . .	77
7.7	Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda theta	78
7.8	Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda alpha	79
7.9	Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda beta	79

Indice

Abstract	i
1 Introduzione	1
2 Anatomia e Fisiologia del Sistema Nervoso	3
2.1 Organizzazione	3
2.2 Cellule Nervose e Potenziale d’Azione	3
2.3 Sinapsi e Neurotrasmettitori	5
2.4 Encefalo e Corteccia Cerebrale	6
3 EEG	11
3.1 Origine del segnale EEG	11
3.2 Misurazione del segnale EEG	13
4 Stimolazione Magnetica Transcranica	15
4.1 Introduzione	15
4.2 Principi fisici	15
4.3 Caratteristiche tecniche	16
4.3.1 Generatore di impulsi	17
4.3.2 Bobina di stimolazione	17
4.3.3 Logica di controllo	18
4.4 Protocolli di stimolazione	19
5 Network Cerebrali	21
5.1 Introduzione	21
5.2 Storia dei Network Cerebrali	22
5.3 EEG per l’Analisi dei Network	26
5.3.1 Problema Inverso - Ricostruzione dello Spazio Sorgente	26
5.3.2 Analisi della Connettività	30

5.3.3 Teoria dei Grafi	34
6 Materiali & Metodi	37
6.1 Set-up Sperimentale	37
6.2 Pre-Processing dei dati	43
6.3 Ricostruzione Spazio Sorgente	46
6.4 Calcolo della connettività	49
7 Risultati & Discussione	55
7.1 Risultati	55
7.2 Discussione	74
8 Conclusione	81
Bibliografia	85
Sitografia	91

Capitolo 1

Introduzione

Il corpo umano è da sempre oggetto di studio. Una macchina estremamente sofisticata, regolata dall’interazione perfetta tra i suoi innumerevoli ingranaggi. Ogni sistema, con i suoi organi, conosce alla perfezione il proprio compito: quello digerente si occupa di assimilare le sostanze nutritive, il sistema linfatico protegge da eventuali agenti patogeni, il sistema cardiovascolare porta il nutrimento necessario ad ogni cellula, e così via con gli altri sistemi fondamentali. La domanda che sorge spontanea è la seguente: chi muove ogni singolo ingranaggio e come fa a funzionare in maniera così precisa? A capo di tutta questa meticolosa organizzazione si pone il sistema nervoso, il cui compito consiste nel ricevere informazioni provenienti da diverse zone del corpo, elaborarle accuratamente e inviare istruzioni ottimizzate per il miglior funzionamento dell’organismo intero. L’esplorazione dell’anatomia e della fisiologia del sistema nervoso offre una base indispensabile per comprendere le modalità attraverso cui esso elabora stimoli esterni e interni. La letteratura insegna che la corteccia cerebrale, la sede dell’elaborazione delle informazioni, è suddivisa in numerose regioni cerebrali, all’interno delle quali i neuroni si occupano di compiti specifici mentre comunicano con quelli appartenenti ad altre regioni per integrare diverse informazioni, il tutto molto rapidamente. Ecco che si creano delle vere e proprie reti di comunicazione, il cui meccanismo rimane ancora in parte sconosciuto. In questo contesto, l’obiettivo di questo lavoro è evidenziare come uno stimolo magnetico ad alta intensità influenzi l’organizzazione della corteccia cerebrale. Le domande che ci si pongono all’inizio sono: uno stimolo magnetico transcranico provoca una perturbazione della rete? Se sì, quali network si attivano maggiormente?

La tesi è articolata in due parti principali, che descrivono e documentano il percorso svolto per raggiungere gli obiettivi della ricerca. La prima parte è dedicata al background teorico ed è volta a fornire le conoscenze necessarie per comprendere i meccanismi alla base del funzionamento del cervello umano, la natura del segnale bioelettrico studiato e la sua registrazione tramite sistemi EEG. Vengono inoltre approfonditi i principi fisici e operativi della Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS), insieme all’evoluzione dello studio delle reti cerebrali e all’impiego dell’EEG

Capitolo 1. Introduzione

come strumento di imaging funzionale. Nella seconda parte, invece, viene documentato il percorso sperimentale, spiegando in modo dettagliato il set-up sperimentale e la successiva elaborazione dei dati. Per concludere sono riportati i risultati ottenuti e la relativa discussione.

Capitolo 2

Anatomia e Fisiologia del Sistema Nervoso

2.1 Organizzazione

Il sistema nervoso è organizzato in due componenti che operano in sinergia. Il Sistema Nervoso Centrale (SNC), costituito da encefalo e midollo spinale, funge da centro di controllo: riceve i segnali provenienti dall'organismo, li integra ed elabora e genera le risposte. Il Sistema Nervoso Periferico (SNP), formato da nervi e gangli, è la rete di collegamento: convoglia le informazioni dai recettori al SNC (via afferente) e, una volta definita la risposta, trasmette gli ordini dal SNC a muscoli e ghiandole (via efferente).

2.2 Cellule Nervose e Potenziale d'Azione

Ogni sistema del corpo umano funziona correttamente grazie alla cooperazione tra le proprie unità funzionali. Ogni apparato infatti è dotato di cellule altamente specializzate per il compito che deve svolgere. Il sistema nervoso non fa eccezione, infatti è composto da un numero molto elevato di cellule, suddivise in due tipologie differenti: quelle strutturali, dette gliali e quelle eccitabili, i neuroni.

Le cellule gliali sono circa dieci-cinquanta volte più numerose dei neuroni e hanno come compito principale il supporto strutturale e metabolico delle cellule eccitabili [20]. All'interno di questo raggruppamento esistono diversi sottogruppi, ognuno con un compito specifico. Le cellule microgliali si occupano di intervenire solamente dopo un'infezione o lesione, quindi hanno un ruolo strettamente protettivo. Le cellule macrogiali, invece, comprendono gli astrociti, importanti per il mantenimento delle concentrazioni ioniche nell'ambiente extracellulare e per la crescita dei vari collegamenti neuronali, e infine gli oligodendrociti e le cellule di Schwann, i quali sono fondamentali per la formazione dello strato mielinico presente a tratti lungo gli

assoni, i primi nel sistema nervoso centrale, le altre nel sistema nervoso periferico. I neuroni, pur essendo numericamente inferiori, sono i veri protagonisti del sistema nervoso: costituiscono l'unità funzionale di base. Dal punto di vista strutturale, presentano un corpo cellulare (soma) con il nucleo, dendriti che ricevono le afferenze da altri neuroni e un assone che costituisce la componente efferente. La loro organizzazione varia a seconda della sede. Nel SNC¹ i corpi cellulari si raggruppano in nuclei, mentre gli assoni si allineano a formare vie o tratti. Nel SNP² i corpi si riuniscono in gangli e gli assoni costituiscono i nervi. La funzione è differente. Esistono neuroni efferenti, che trasportano l'informazione dal SNC agli organi effettori comunicando con i motoneuroni (sistema somatico) e con i neuroni del sistema autonomo; neuroni afferenti, che compiono il percorso inverso portando al SNC le informazioni sensoriali e viscerali; e interneuroni, presenti nel SNC, che ricevono i segnali afferenti, li elaborano e inviano nuove istruzioni alla componente efferente [42].

Il compito principale dei neuroni consiste nel propagare l'informazione sottoforma di segnale elettrico. Quest'ultimo prende il nome di potenziale d'azione ed è stato scoperto grazie agli studi di Hodgkin e Huxley. Non è altro che il risultato di una rapida inversione transitoria del potenziale transmembrana a causa dell'apertura di canali voltaggio - dipendenti distribuiti lungo il neurone, soprattutto nelle zone a monte dell'assone [3]. È fondamentale ora capirne il funzionamento.

In situazione di riposo la membrana della cellula è polarizzata negativamente con una differenza di potenziale tra esterno ed interno di circa -70 mV. Questa condizione è possibile grazie ai canali ionici che rimangono sempre aperti, mantenendo il flusso ionico delle varie specie ioniche costante. Tuttavia, i canali sempre aperti non sono gli unici a regolare il flusso di cariche. Esistono infatti canali che si aprono solamente in seguito a stimoli particolari. Essi sono detti "canali con gate" e sono presenti lungo l'assone, in particolare nelle regioni libere da guaina mielinica (*Nodi di Ranvier*). Aprendosi e chiudendosi modificano la permeabilità della membrana, permettendo o impedendo il passaggio di specie ioniche [42]. Si è scoperto che i canali ionici determinanti nella genesi del potenziale d'azione sono quelli che regolano il flusso dello ione sodio (Na^+) e dello ione potassio (K^+). Infatti, non appena arriva uno stimolo, alcuni canali del sodio iniziano ad aprirsi permettendo l'ingresso nella cellula di cariche positive. Il potenziale transmembrana quindi comincia ad aumentare. Nel caso in cui raggiunga il valore di soglia (di solito intorno ai -50 mV) allora si innesca

¹SNC = Sistema Nervoso Centrale

²SNP = Sistema Nervoso Periferico

un'apertura sempre più massiccia dei canali del sodio, aumentando notevolmente l'apporto di cariche positive internamente. In questo momento si osserva l'inversione rapida della polarizzazione, fino a valori prossimi ai +40 mV (fase di *depolarizzazione*). Successivamente, accadono due eventi che portano alla ripolarizzazione della membrana: i canali del sodio iniziano a chiudersi in maniera irreversibile e i canali del potassio cominciano ad aprirsi generando un flusso di cariche positive verso l'esterno. La membrana torna ad essere polarizzata negativamente ma con valori inferiori al potenziale di riposo (*iperpolarizzazione*) a causa della chiusura tardiva dei canali del potassio. L'ultima fase invece prevede un ritorno al valore iniziale di potenziale. Nella figura 2.1 si osserva l'andamento del potenziale di transmembrana nel tempo. Le peculiarità del potenziale d'azione sono principalmente due: il principio del "tutto o nulla" e il periodo refrattario. La regola dice che se viene raggiunto il valore soglia allora si genera un PA³ che mantiene sempre la stessa ampiezza, altrimenti si ottiene solamente un potenziale graduato. Da questa caratteristica si deduce che l'informazione non è contenuta sicuramente nell'ampiezza dei vari PA, poiché una volta generato rimane costante. Per questo motivo i neuroni comunicano tramite modulazione in frequenza, cioè uno stimolo intenso viene rappresentato da un numero molto elevato di potenziali d'azione nell'unità di tempo. Il periodo refrattario, invece, consiste in un breve periodo di tempo, definito come periodo refrattario assoluto, successivo alla prima fase di depolarizzazione, in cui la membrana non può assolutamente essere depolarizzata; seguito da un ulteriore intervallo in cui è necessario uno stimolo molto intenso per produrre un potenziale d'azione (periodo refrattario relativo). Questa caratteristica è alla base della propagazione unidirezionale del potenziale d'azione[3].

2.3 Sinapsi e Neurotrasmettitori

Una volta compresa la struttura del neurone e le caratteristiche dell'informazione che propaga, è necessario capire come riesca a trasmetterla al neurone successivo. In questa situazione entrano in gioco particolari strutture del sistema nervoso: le sinapsi. Possono essere di due tipologie, chimiche ed elettriche. Quest'ultime sono presenti in numero minore e sono ancora oggi oggetto di studio, il loro funzionamento si basa sul passaggio diretto degli ioni e quindi del potenziale d'azione attraverso una

³PA = Potenziale d'Azione

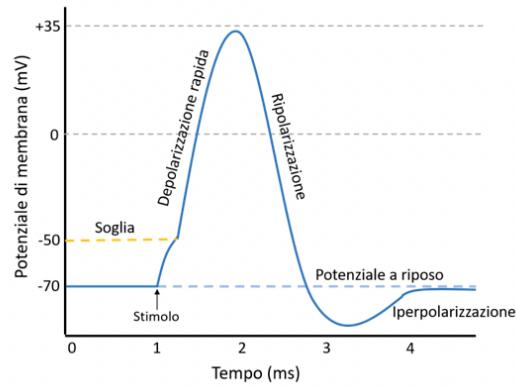


Figura 2.1: Potenziale d'Azione - PA

giunzione comunicante tra due neuroni [42]. Le sinapsi chimiche invece funzionano grazie alla presenza di un agente chimico, detto neurotrasmettitore. Il processo prevede una zona presinaptica, rappresentata dai terminali assonici, dove giunge il potenziale d'azione per innescare il rilascio del neurotrasmettitore. Esso viene diffuso nella fessura sinaptica dove si accumula, pronto ad essere individuato dai recettori posti nella zona postsinaptica, rappresentata principalmente dai dendriti del neurone successivo. Il recettore, una volta legato al proprio neurotrasmettitore, innesca un potenziale graduato, cioè inferiore al valore soglia della membrana, nel nuovo neurone. Esso prende il nome di potenziale postsinaptico (PSP) e può essere eccitatorio (depolarizzante) o inibitorio (iperpolarizzante) a seconda della tipologia di neutrasmettitore e di recettore. Singolarmente non possono generare un potenziale d'azione, ma possono essere sommati tra loro temporalmente o spazialmente per raggiungere il valore soglia.

Per concludere, è bene citare qualche esempio di neurotrasmettitore, in particolare la famiglia degli amminoacidi composta da glutammato, considerato eccitatorio poiché il suo recettore genera una depolarizzazione, glicina e GABA, considerati, al contrario, inibitori a causa dell'iperpolarizzazione provocata dai propri recettori [5].

2.4 Encefalo e Corteccia Cerebrale

Le unità di base di questo sistema sono organizzate in una struttura macroscopica più complessa, l'encefalo.

Considerata la sua importanza, esso è protetto esternamente dal cranio, da tre strati di tessuto connettivo, cioè le meninge e dal liquido cerebrospinale, distribuito nelle cavità più interne grazie alle sue proprietà fluide. L'encefalo costituisce il sistema nervoso centrale, insieme al midollo spinale, e anatomicamente è un complesso di strutture coordinate che svolgono compiti specifici nel momento in cui ricevono informazioni provenienti dal sistema periferico. È costituito, precisamente, dal prosencefalo — che comprende cervello e diencefalo —, dal cervelletto e dal tronco encefalico. Un'organizzazione estremamente coordinata che permette all'encefalo di fornire al corpo umano i segnali necessari per il movimento, per il ragionamento, per le emozioni e per la comunicazione. La struttura è suddivisa in due emisferi, destro e sinistro, che comunicano costantemente grazie al corpo calloso. Ogni emisfero controlla i movimenti della parte controlaterale del corpo e viene coinvolto per compiti e situazioni differenti. Ad esempio quello sinistro si occupa principalmente del linguaggio e dei compiti che richiedono un approccio logico, mentre quello destro predomina nelle mansioni più creative e intuitive. Un fenomeno noto come lateralizzazione dell'encefalo [45].

Lo strato più esterno dell'encefalo è la corteccia cerebrale, la sede di un numero straordinario di neuroni. I corpi cellulari, come detto precedentemente, sono agglomerati in nuclei e formano la sostanza grigia. Internamente, invece, gli assoni si allineano per formare fibre mieliniche (sostanza bianca) necessarie per il collegamento di diverse aree del sistema nervoso. Ne esistono di diverse tipologie: fibre di proiezione, per collegamenti tra corteccia ed strutture più interne, fibre di associazione, per connessioni tra diverse regioni corticali appartenenti allo stesso emisfero, e fibre commisurali, per la comunicazione tra i due emisferi. La materia grigia della corteccia è un insieme di strati e di invaginazioni di tessuto nervoso molto sottile, circa 2-3 millimetri, ma coprente un'area pari a qualche centinaia di centimetro quadro. Un'organizzazione del genere permette di ottimizzare la richiesta metabolica corticale, ottenendo inoltre ritardi di conduzione minori rispetto ad una struttura in cui materia grigia e materia bianca sono mescolate. Alcuni studi hanno dimostrato che i neuroni appartenenti alla stessa colonna, quindi perpendicolari ai vari strati, condividono proprietà simili, come ad esempio la risposta alla stessa zona sensoriale cutanea, mentre a livello laminare i nuclei sono organizzati in base alla funzione di ricezione e invio dei segnali. I neuroni della corteccia possono essere distinti in due categorie, quelli eccitatori, detti piramidali e quelli inibitori, presenti in numero minore. I neuroni piramidali appartengono allo strato in cui si trova il soma, nonostante i propri dendriti possano

attraversare diversi strati. La loro distribuzione è definita da un sistema *inside-out*, ovvero nascono e poi si posizionano, muovendosi radialmente, dallo strato più interno (*VI*) allo strato più superficiale (*I*), il quale però è definito privo di cellule [39]. Spostandosi da una colonna di neuroni a quella successiva le proprietà iniziano a cambiare gradualmente. La loro distribuzione genera quattro regioni corticali, anatomicamente definite "lobi", ognuna delle quali è specializzata in una diversa funzione. Il lobo frontale è localizzato anteriormente mentre il lobo parietale subito dopo il solco centrale. Nella zona posteriore del cranio è posto il lobo occipitale. Invece lateralmente, al di sotto del frontale e parietale, si trova il lobo temporale. Ciascun lobo è organizzato in modo tale da raggruppare diverse aree, le quali si differenziano in primarie e associative. Le prime vengono chiamate in questo modo perché si occupano dell'elaborazione iniziale dei segnali provenienti dal sistema nervoso periferico, quindi quella più semplice. Tra queste si trovano la corteccia visiva primaria, posizionata nel lobo occipitale, la corteccia uditiva primaria, posta nel lobo temporale, la corteccia motoria primaria e premotoria, poste nella parte superiore del lobo frontale, prima del solco centrale, e infine la corteccia somatosensoriale primaria, posizionata nel lobo parietale, subito dopo il solco centrale. Le aree associative, al contrario, sono responsabili dell'elaborazione più complessa dei segnali perché integrano le informazioni provenienti da diverse regioni. Tra queste è bene ricordare le prefrontali, le sensoriali, le limbiche e quelle di Wernicke e Broca, le quali si occupano rispettivamente della comprensione e della formazione del linguaggio. Nella figura 2.2 è possibile osservare la distribuzione dei quattro lobi principali.

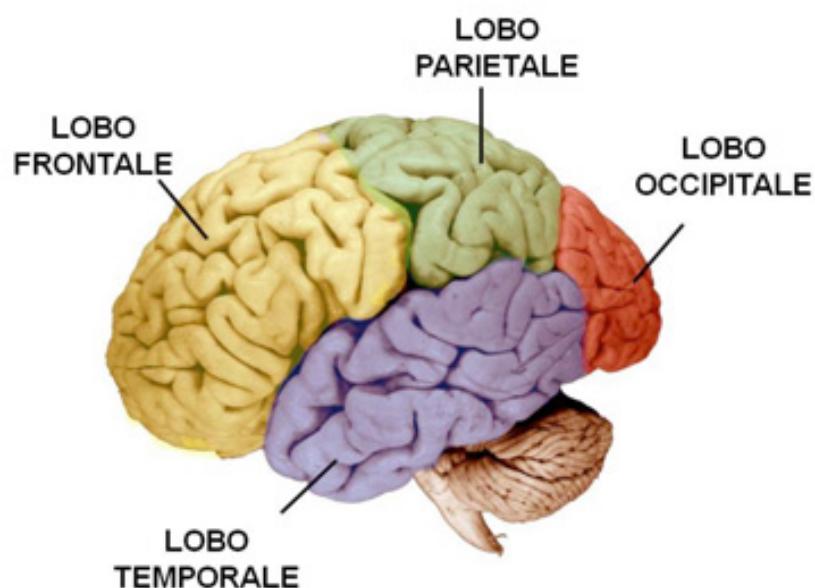


Figura 2.2: Lobi Corteccia Cerebrale

Capitolo 3

EEG

L'**elettroencefalografia (EEG)** è utilizzata in questo studio come strumento principale per osservare e analizzare la dinamica cerebrale indotta dalla TMS. La combinazione delle due tecniche consente di esplorare le interazioni funzionali tra diverse aree corticali, valutando come un impulso magnetico locale possa modulare l'attività di regioni distribuite. Per comprendere pienamente il significato fisiologico e tecnico delle registrazioni EEG acquisite in combinazione con la TMS, è utile richiamare brevemente i principi di funzionamento dell'elettroencefalografia. Nelle sezioni seguenti verranno quindi descritti i meccanismi bioelettrici alla base della generazione del segnale EEG, le modalità di acquisizione e i principali passaggi di elaborazione che ne permettono l'interpretazione a livello corticale.

3.1 Origine del segnale EEG

Il segnale EEG misurato sullo scalpo deriva dalla sincronizzazione dell'attività sinaptica dei neuroni corticali, che prendono il nome di cellule piramidali, organizzate in colonne all'interno della corteccia cerebrale. Nel momento in cui i neuroni postsinaptici sono eccitati, si genera un dipolo elettrico: una zona caratterizzata dalla vicinanza di un gruppo di cariche positive separato da uno di cariche negative. La disposizione e l'orientamento dei dipoli è fondamentale per la registrazione del segnale da parte degli elettrodi. Un elettrodo, infatti sarà in grado di misurare una differenza netta di carica solamente se è posizionato più vicino all'estremo "positivo" del dipolo oppure a quello "negativo". Inoltre, bisogna considerare che un elettrodo non è in grado di misurare l'attività di un singolo dipolo, ma registrerà la somma temporale e spaziale dell'attività elettrica nella zona dello scalpo sottostante. Per questo motivo, per ottenere un segnale migliore è importante che i dipoli presenti al di sotto di un singolo elettrodo siano, per esempio, organizzati parallelamente tra loro, in modo tale abbiano uno dei due poli orientato spazialmente nello stesso modo. A livello temporale, per ottenere un segnale migliore è necessario che l'attività elettrica sia

sincronizzata, altrimenti il segnale prelevato sarà un alternarsi casuale di cariche positive e negative.

Le cariche si muovono all'interno del liquido intracellulare ma il segnale EEG deriva dalla distribuzione delle cariche nel liquido extracellulare. Un breve esempio potrebbe aiutare a capire meglio la situazione. Si immagini un neurone piramidale orientato perpendicolarmente rispetto al cranio, il soma disposto internamente e i dendriti apicali posizionati superficialmente. Nel momento in cui un potenziale postsinaptico eccitatorio (EPSP) giunge ad un dendrite apicale, le cariche elettriche (Na^+) iniziano a muoversi all'interno del neurone e contemporaneamente il fluido extracellulare diventa negativo intorno al dendrite. Al contrario, la regione in cui la corrente fuoriesce dal neurone, diventa localmente più positiva. In questa situazione, un elettrodo superficiale sarebbe più vicino al polo negativo e quindi registrerebbe una deflessione negativa del potenziale allo scalpo. Potrebbe invece capitare un EPSP a livello del soma e questo genererebbe una situazione in cui il polo positivo sarebbe posizionato superficialmente, portando ad una deflessione positiva del potenziale. Tuttavia, gli elettrodi sono superficiali quindi necessitano che la distribuzione delle cariche nel liquido extracellulare venga propagata fino alla superficie. Questo avviene grazie al volume conduttore, al cui interno cariche di segno opposto si attraggono mentre cariche dello stesso segno si respingono dando origine ad una distribuzione alternata di cariche che giunge fino allo strato più esterno, pronta per essere rilevata dagli elettrodi. Fin qui sembra tutto molto semplice ma le difficoltà si nascondono proprio dietro a questi passaggi. La distribuzione delle cariche è influenzata dalle caratteristiche elettriche del volume conduttore, le quali non possono essere considerate omogenee nei vari tessuti che lo compongono. Esistono tessuti che sono più permeabili al passaggio degli ioni, altre meno. Dal punto di vista elettrico ciascun tessuto potrebbe essere paragonato ad un condensatore con all'interno un dielettrico che permette alle cariche di distribuirsi sulle "armature" del tessuto. Inoltre, precedentemente sono state definite gli orientamenti ideali che dovrebbero avere i neuroni e quindi i dipoli per riuscire a registrare un ottimo segnale EEG. Tuttavia, è impossibile ipotizzare che tutti i neuroni abbiano lo stesso orientamento, ma soprattutto che abbiano la stessa forma e dimensione, di conseguenza i modelli di dipoli sono in grado di generare segnali più o meno intensi. Tuttociò influenza anche la possibilità che il segnale giunga efficacemente alla superficie dello scalpo [44].

3.2 Misurazione del segnale EEG

Nel momento in cui il segnale giunge alla superficie dello scalpo, è necessario che sia presente un materiale in grado di formare un nuovo strato conduttore anche all'esterno del cranio. In questa maniera, gli ioni possono fluire per raggiungere la superficie dell'elettrodo, altrimenti verrebbero bloccati dagli strati caratterizzati da deboli proprietà conduttrive. In poche parole, l'aggiunta di gel elettrolitico permette di diminuire l'impedenza degli strati esterni allo scalpo.

Ogni elettrodo si occupa di rilevare la presenza delle cariche sulla sua superficie inviando all'amplificatore un input una volta ogni 1-2 ms circa per le registrazioni classiche, cioè lavora ad una frequenza di campionamento tipicamente di 1000 o 500 Hz. Questo garantisce di campionare senza problemi di aliasing la banda del segnale EEG, che può essere definita tra 0.1 Hz e circa 80 Hz, nonostante la maggior parte delle informazioni registrabili sia contenuta fino ai 30 Hz, poiché frequenze superiori sono attenuate dai tessuti cerebrali che funzionano da filtro passa-basso. L'intera banda può essere a sua volta suddivisa in sotto-bande strette, ognuna delle quali prevale in base alla situazione in cui sta operando il cervello. La suddivisione classica deriva dalle analisi del sonno. Durante la veglia si osservano onde prevalentemente ad alta frequenza con ampiezza molto bassa, cioè nell'ordine di grandezza di pochi micro-volt (μV). In questa situazione si riescono ad osservare onde con ritmo beta, definite in una banda compresa tra 12/13 Hz e 30 Hz. Nel momento in cui si passa ad una veglia maggiormente rilassata, la frequenza del segnale cala mentre l'ampiezza aumenta, si osservano quindi onde a ritmo alfa che oscillano con frequenze comprese tra 8 Hz e 12/13 Hz. Infine, nelle prime fasi del sonno, l'ampiezza del segnale aumenta sempre di più mentre la frequenza cala ulteriormente. Infatti, iniziano ad osservarsi le onde con ritmo theta (4-8 Hz) e successivamente le onde con ritmo delta (0.1 - 4 Hz) [42].

Registrare segnale elettroencefalografico non è affatto semplice. Le principali problematiche derivano dal posizionamento dei dipoli e dalle loro dimensioni, ma esistono contemporaneamente difficoltà portate dall'apparecchiatura esterna o direttamente dal soggetto che si sottopone alla registrazione. Idealmente un elettroencefalogramma dovrebbe essere l'insieme di tutte le componenti cerebrali rilevate. Tuttavia, l'elettrodo non registra solamente attività cerebrale ma rileva anche molte altre componenti che si raggruppano nel termine "rumore", cioè tutto ciò che non dipende dall'attivazione dei neuroni. Il rumore esterno è prodotto dalle varie apparecchiature

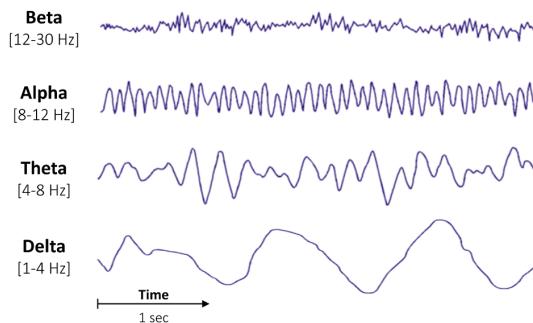


Figura 3.1: Ritmi del segnale EEG

posizionate nella stessa stanza in cui viene svolta la registrazione oppure dallo stesso elettroencefalografo che per funzionare deve essere collegato alla corrente elettrica, la quale introduce all'interno del segnale una fortissima componente a 50 Hz (oppure 60 Hz negli Stati Uniti). Inoltre lo stesso soggetto può essere causa di rumore interno poichè l'elettrodo rileva segnali che derivano da altre parti del corpo. Gli esempi più classici sono l'attività cardiaca, il movimento oculare, registrato soprattutto dagli elettrodi prossimi agli occhi, e infine i vari artefatti muscolari che si presentano nei tracciati EEG come componenti ad alta frequenza, che rendono ancora più complicata la rilevazione di componenti cerebrali oltre i 30 Hz coprendole completamente. L'insieme di tutte queste componenti esterne rende ancora più difficoltosa l'interpretazione di un elettroencefalogramma. Non esiste un metodo che permette di eliminare tutte queste attività indesiderate, ma possono essere prese delle misure di contenimento per limitarle il più possibile. A livello hardware è molto importante che il sistema utilizzato per la registrazione garantisca un amplificatore in grado di migliorare il rapporto tra il segnale e il rumore (SNR) [44]. In pratica, migliore è l'amplificatore, maggiori sono le possibilità di ottenere un tracciato che riflette il segnale cerebrale anche in condizioni di registrazione non ideali. Quasi sempre la soluzione hardware non è sufficiente e diventa necessaria l'integrazione software, entrando quindi nella fase di "signal pre-processing". L'obiettivo consiste nel migliorare ulteriormente il SNR limitando tuttociò che prima è stato definito come "rumore" attraverso l'applicazione di filtri digitali e l'uso di analisi delle componenti come l'ICA¹. In questo modo si può attenuare ciò che fuoriesce dalla banda di interesse e individuare le componenti esterne a quelle cerebrali.

¹ICA = *Independent Components Analysis*

Capitolo 4

Stimolazione Magnetica Transcranica

4.1 Introduzione

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) è una tecnica di neuromodulazione non invasiva che consente di modulare l'attività neuronale corticale attraverso l'applicazione di campi magnetici impulsivi. Il principio di base si fonda sull'induzione elettromagnetica, per cui una variazione rapida del campo magnetico, generata da una bobina posizionata sul cuoio capelluto, induce correnti elettriche focalizzate nei tessuti cerebrali sottostanti. Questa tecnica permette di intervenire in modo controllato sull'eccitabilità corticale, producendo effetti che possono essere sia a breve che a lungo termine, a seconda del protocollo di stimolazione utilizzato. Grazie a tali caratteristiche, la TMS rappresenta oggi uno strumento chiave per studiare la fisiologia cerebrale, investigare le connessioni tra regioni corticali e, in ambito clinico, modulare la plasticità neuronale a scopo terapeutico. La sua applicazione spazia infatti dalla ricerca neurofisiologica alla pratica clinica, con impieghi nel trattamento di disturbi motori, psichiatrici e cognitivi. In questo lavoro di tesi, la TMS viene considerata non solo come strumento di stimolazione, ma anche come mezzo di indagine funzionale, in particolare quando combinata con tecniche quali l'elettroencefalografia (EEG) per valutare l'attivazione dei network cerebrali.

4.2 Principi fisici

La Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) si fonda sui principi dell'elettromagnetismo, in particolare sulle leggi di Ampère-Maxwell e di Faraday, che descrivono la reciproca interazione tra campi elettrici e magnetici variabili nel tempo. Quando una corrente impulsiva attraversa una bobina conduttrice, genera un campo magnetico variabile che, a sua volta, induce un campo elettrico nei tessuti conduttori circostanti.

La legge di Ampère-Maxwell stabilisce che la circolazione del campo magnetico attorno a un percorso chiuso è proporzionale alla somma della corrente conduttriva e della variazione temporale del flusso elettrico:

$$\oint_{\partial S} \vec{B} \cdot d\vec{l} = \mu_0 I_{\text{cond}} + \mu_0 \varepsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt} \quad (4.1)$$

dove I_{cond} rappresenta la corrente che attraversa la superficie S , mentre il secondo termine descrive la corrente di spostamento, necessaria per mantenere la continuità del campo magnetico anche in assenza di corrente conduttriva. Nel generatore TMS, correnti di intensità elevata (nell'ordine dei kA) e di durata estremamente breve (centinaia di microsecondi) fuiscono attraverso la bobina, producendo campi magnetici intensi e rapidamente variabili. La distribuzione del campo generato da una singola spira circolare di raggio R è descritta dalla legge di Biot-Savart:

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int \frac{I d\vec{l} \times \hat{\vec{r}}}{r^2} \quad (4.2)$$

Nel centro della spira, il campo risultante è perpendicolare al piano della bobina e la sua intensità è data da:

$$B = \frac{\mu_0 N I}{2R} \quad (4.3)$$

dove N è il numero di spire. L'intensità del campo decresce rapidamente con la distanza dalla superficie della bobina, seguendo una legge approssimativamente cubica. Le rapide variazioni del campo magnetico $B(t)$ inducono, secondo la legge di Faraday-Neumann-Lenz, un campo elettrico nei tessuti cerebrali sottostanti. Le correnti indotte si distribuiscono prevalentemente in direzione tangenziale alla corteccia, e quando la loro intensità supera la soglia di eccitabilità neuronale, determinano la depolarizzazione delle membrane cellulari e l'attivazione di popolazioni di neuroni piramidali [50].

4.3 Caratteristiche tecniche

In accordo con la suddivisione proposta in [16], lo stimolatore per Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) può essere analizzato in termini dei suoi moduli principali. Ciascun modulo svolge un ruolo specifico nella generazione, nel controllo e nell'erogazione della stimolazione magnetica. In particolare, l'architettura di uno stimolatore TMS può essere schematizzata nei seguenti blocchi funzionali:

1. **Modulo di generazione degli impulsi**, responsabile della produzione della corrente ad alta intensità;
2. **Modulo di stimolazione**, rappresentato dalla bobina che converte la corrente in un campo magnetico variabile;
3. **Modulo di controllo e sicurezza**, incaricato della gestione dei parametri di stimolazione e della protezione del sistema.

4.3.1 Generatore di impulsi

Il generatore di impulsi può essere descritto mediante un circuito equivalente composto da pochi elementi funzionali fondamentali, ciascuno con un ruolo specifico nella produzione dell'impulso magnetico. Il modulo di alimentazione ad alta tensione carica un condensatore di accumulo, che funge da serbatoio energetico del sistema. Durante la stimolazione, l'energia immagazzinata viene rapidamente trasferita alla bobina di stimolazione, rappresentata nel circuito dall'induttanza, dove viene convertita in un campo magnetico variabile nel tempo capace di indurre correnti nei tessuti corticali. La resistenza del circuito tiene conto delle perdite dissipative nei conduttori e nei materiali, mentre un interruttore di potenza — generalmente un tiristore — regola la fase di scarica del condensatore verso la bobina, consentendo l'erogazione di impulsi controllati e ripetibili. Il circuito è completato da un diodo di protezione, che previene inversioni di corrente o oscillazioni residue successive alla scarica, preservando l'integrità dei componenti elettronici. Nel complesso, il sistema realizza una scarica risonante controllata, in cui l'energia elettrica viene convertita in campo magnetico con perdite minime. Gli impulsi prodotti raggiungono tipicamente intensità comprese tra 1 e 2 T [47], con durata e forma d'onda dipendenti dai parametri elettrici del circuito.

4.3.2 Bobina di stimolazione

La bobina di stimolazione è l'elemento responsabile della conversione della corrente impulsiva in campo magnetico variabile nel tempo. La sua geometria determina la distribuzione spaziale del campo elettrico indotto e quindi la precisione della stimolazione corticale. La bobina circolare singola, costituita da un avvolgimento di filo conduttore disposto su un piano, genera un campo magnetico assiale concentrato

lungo il proprio asse centrale e decrescente radialmente. Il campo elettrico indotto assume una distribuzione concentrica, stimolando un'area relativamente ampia della corteccia. Il principale limite di questa configurazione è la scarsa focalità, che rende difficile localizzare con precisione la stimolazione su regioni corticali specifiche. Per superare tale limite, si impiega comunemente la bobina a otto (*figure-of-eight*), composta da due spire adiacenti percorse da correnti opposte. L'interferenza dei due campi magnetici genera un massimo del campo elettrico indotto nel punto di intersezione, consentendo una maggiore focalità e una stimolazione più precisa, con una profondità di penetrazione simile a quella della bobina circolare. Grazie a queste caratteristiche, la configurazione a otto rappresenta la soluzione più utilizzata nelle applicazioni cliniche e di ricerca, dove è richiesta un'elevata accuratezza spaziale [9].

4.3.3 Logica di controllo

Il modulo di controllo e sicurezza gestisce il funzionamento complessivo dello stimolatore, coordinando la generazione, la temporizzazione e il monitoraggio degli impulsi. Attraverso un sistema di elettronica di controllo, esso regola la tensione di carica del condensatore, il momento di attivazione dell'interruttore di potenza e la sequenza temporale degli impulsi, in accordo con il protocollo di stimolazione impostato. Tali parametri possono essere variati tramite un'interfaccia software che consente di selezionare intensità, frequenza e durata della stimolazione, garantendo un'elevata ripetibilità delle condizioni operative. Il modulo integra inoltre un insieme di sistemi di sicurezza progettati per proteggere sia l'operatore sia il soggetto stimolato. Tra questi rientrano i circuiti di interlock, che impediscono l'erogazione dell'impulso in caso di condizioni non sicure, i sensori di corrente e tensione per il monitoraggio in tempo reale dei parametri elettrici, e i sensori termici per la protezione da eventuali surriscaldamenti della bobina. In molti dispositivi, il sistema di controllo è anche collegato a meccanismi di arresto d'emergenza e a routine di autodiagnosi, che garantiscono l'interruzione immediata della stimolazione in presenza di anomalie. Nel complesso, questo modulo rappresenta l'interfaccia tra la parte di potenza e il livello di programmazione, assicurando che la stimolazione avvenga in modo preciso, ripetibile e sicuro, in conformità con i parametri definiti dai protocolli di stimolazione [36].

4.4 Protocolli di stimolazione

Nel contesto della Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS), il termine protocollo di stimolazione indica l’insieme dei parametri che definiscono le modalità di erogazione degli impulsi magnetici nel tempo e nello spazio. Così come la progettazione del circuito e della bobina determina la qualità fisica dell’impulso, il protocollo di stimolazione ne stabilisce la frequenza, la durata e l’intensità, traducendo il funzionamento dello stimolatore in un effetto neurofisiologico misurabile. I principali parametri che caratterizzano un protocollo di stimolazione sono la frequenza di erogazione degli impulsi, la durata totale della sessione, l’intervallo tra le scariche e l’intensità di stimolazione, solitamente espressa come percentuale della soglia motoria individuale. Quest’ultima rappresenta la minima intensità in grado di evocare una risposta motoria rilevabile e consente di calibrare la stimolazione sulle caratteristiche fisiologiche del soggetto, garantendo sicurezza e riproducibilità. Anche la forma d’onda della corrente influisce sulla risposta neurofisiologica. Gli stimolatori possono generare impulsi di tipo monofasico, in cui la corrente fluisce in una sola direzione e ritorna gradualmente allo zero, oppure bifasico, caratterizzati da una rapida inversione di polarità. Gli impulsi monofasici tendono a essere più focali e selettivi, mentre quelli bifasici risultano più efficienti e diffusi. La scelta tra le due configurazioni dipende dall’obiettivo sperimentale o terapeutico, poiché ciascuna coinvolge differenti popolazioni neuronali. Tra i protocolli più utilizzati in ambito clinico e di ricerca vi sono quelli a stimolazione ripetitiva (repetitive TMS, rTMS), nei quali impulsi successivi vengono applicati a frequenze costanti [47]. Le rTMS a bassa frequenza vengono impiegate per modulare regioni iperattive, mentre quelle ad alta frequenza sono utilizzate per potenziare aree ipoattive, come la corteccia dorsolaterale prefrontale nel trattamento della depressione resistente. Un’evoluzione dei protocolli rTMS è rappresentata dalla Stimolazione a Theta Burst (Theta Burst Stimulation, TBS), che prevede la somministrazione di brevi treni di impulsi ad alta frequenza (tipicamente 50 Hz) ripetuti a intervalli di 5 Hz, riproducendo i ritmi theta dell’attività cerebrale. Questo schema consente di ottenere effetti di modulazione sinaptica paragonabili alla rTMS convenzionale, ma con una durata di applicazione notevolmente inferiore e un consumo energetico ridotto. Le due varianti principali, intermittent (iTBS) e continuous (cTBS), inducono rispettivamente effetti facilitatori e inibitori sull’eccitabilità corticale, rappresentando oggi le modalità più studiate e diffuse sia in ambito clinico che neuroscientifico [18].

Capitolo 5

Network Cerebrali

5.1 Introduzione

Scoperte del XX secolo hanno mostrato che le diverse funzioni dell'encefalo sono localizzate nelle sue varie strutture. Anche la corteccia cerebrale presenta regioni distribuite, ciascuna con uno specifico compito. A sostegno di ciò si osservò che un danno circoscritto in una determinata area corticale provoca un deficit specifico, mentre l'elettrostimolazione della sola area motoria può generare una risposta motoria. Questi furono i primi riscontri; più recentemente si è evidenziato che tale distribuzione è coerente con la citoarchitettura, ossia con le proprietà delle cellule nervose che caratterizzano ogni regione corticale. Infine, studi moderni basati su tecniche di neuroimaging hanno confermato quanto ipotizzato. Successivamente è nata l'ipotesi che l'elaborazione dei dati ricevuti nell'encefalo richieda connessione tra le diverse aree per integrare diverse funzioni. La domanda che sorge spontanea è: come vengono scambiate queste informazioni? L'obiettivo consiste nel tentare di ricostruire la rete che descrive nel migliore dei modi il funzionamento della corteccia cerebrale. L'approccio più utilizzato prevede di sfruttare la teoria dei gradi, uno strumento matematico applicabile nello studio di qualsiasi rete biologica e non. Gli elementi base dei grafi sono i nodi e le loro connessioni, dette archi. Inoltre, questa teoria permette di determinare alcune proprietà globali della rete, come la presenza di elementi ricchi di connessioni (*hub*), l'esistenza di "comunità", ovvero sottogruppi fortemente connessi, ed eventuali ponti tra comunità. La corteccia cerebrale può essere rappresentata come una rete in cui le diverse aree sono i nodi, mentre le connessioni anatomiche o funzionali sono gli archi, che sono valutate tramite diverse misure di correlazione sulla base del segnale e del metodo di imaging che si sta utilizzando. Le difficoltà in questo tipo di analisi derivano dai vincoli biologici imposti, i quali, la maggior parte delle volte, possono condurre ad una rappresentazione non corretta delle reti cerebrali. La definizione dei nodi e degli archi richiede alcune assunzioni. Ad esempio, la dimensione che un nodo è in grado di rappresentare dipende dalla risoluzione

della tecnica di imaging a disposizione, spesso è forzata ad essere fissa, limitando la versione biologica che vede le aree prettamente eterogenee. Nel caso degli archi invece, è necessario considerare la presenza di connessioni dirette, anatomiche, ma anche connessioni indirette e funzionali. Inoltre, una valutazione binaria delle connessioni potrebbe condurre ad una semplificazione eccessiva, dunque è preferibile quantificare il peso delle varie connessioni [51].

Lo studio dei network cerebrali non può limitarsi a un'unica prospettiva, ma richiede di distinguere e integrare diverse tipologie di connessioni. Le connessioni anatomiche descrivono i collegamenti strutturali effettivi tra regioni. Le connessioni funzionali, invece, si basano sulla relazione temporale tra segnali rappresentativi di aree differenti. Infine, le connessioni effettive cercano di catturare la direzionalità e la causalità dell'interazione, ovvero in che direzione si muove l'informazione [2].

5.2 Storia dei Network Cerebrali

Le prime ipotesi, riguardo alle funzioni localizzate in specifiche zone della corteccia cerebrale, sorsegono durante il '700. Alcuni scienziati dell'epoca, infatti, iniziarono ad ipotizzare che alcuni deficit fossero strettamente correlati a danni cerebrali localizzati. Nel 1861 Paul Broca presentò il caso di Leborgne, in cui un paziente di nome "Tan" non riusciva a parlare in maniera articolata. Dopo la morte, l'autopsia mostrò una lesione estesa dell'emisfero sinistro, conducendo Broca a concludere che la perdita del linguaggio fosse associata ad un danno unilaterale del lobo frontale sinistro. Alcuni studi successivi, su pazienti che presentavano afasia motoria, permisero a Broca di dichiarare ufficialmente che la sede corticale per la formazione del linguaggio si trovasse nella terza circonvoluzione frontale sinistra [24]. Nel 1874, un neurologo tedesco, Carl Wernicke, analizzò pazienti con un altro tipo di deficit del linguaggio, ovvero questi pazienti riuscivano a formulare delle parole ma sconnesse tra loro e, soprattutto, non riuscivano a comprendere ciò che veniva detto. Tutti questi pazienti erano accomunati da lesioni localizzate nel giro temporale superiore dell'emisfero sinistro, un'area che coincide con parte della corteccia uditiva [19]. Questi furono i primi casi documentati a sostegno dell'ipotesi che la corteccia cerebrale sia un insieme di aree specializzate in diverse funzioni.

Nei primi anni del '900, un professore tedesco, Korbinian Brodmann, diede vita ad un'opera fondamentale per gli studi neuroanatomici. Il suo trattato più famoso venne pubblicato nel 1909 e fu dedicato completamente alla citoarchitetttonica, definita

proprio da Brodmann come "la localizzazione dei singoli elementi istologici, la loro stratificazione e parcellazione nel cervello adulto" [33]. Egli riuscì ad identificare 47 aree distinte nell'uomo (figura 5.1) e 52 nei primati, ognuna delle quali definita da un pattern cellulare e laminale caratteristico. Il suo lavoro è ancora oggi utilizzato in moltissimi ambiti, come la neurochirurgia, le neuroscienze e neurologia. Nonostante le numerose critiche ricevute per avere dedicato poco tempo alle funzioni di queste aree, Brodmann pose le basi per una comprensione anatomica standard della corteccia, un passo ritenuto necessario per l'integrazione con la funzionalità cerebrale. Alcune aree, infatti, sono state poi associate a funzioni specifiche, come, ad esempio, l'area 4 rappresenta la corteccia motoria primaria, mentre l'area 17 la corteccia visiva primaria [26].

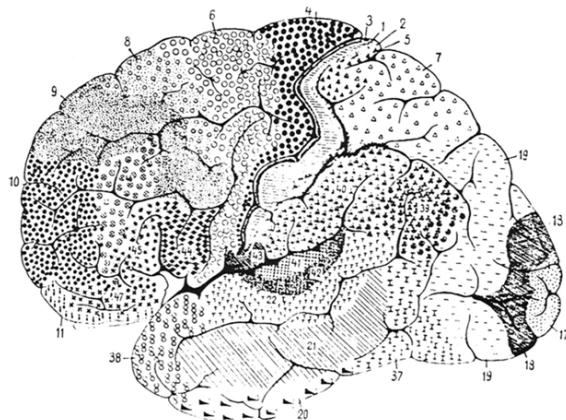


Figura 5.1: Aree di Brodmann da "The Principles of Comparative Localization in the Cerebral Cortex Based on Cytoarchitectonics - 1909" [26]

Nel 1965 un neurologo americano, Norman Geschwind si occupò di rafforzare la teoria secondo cui l'encefalo sia una rete connessa. Scrisse un trattato intitolato "*Disconnection syndromes in animals and man*", nel quale spiegò come alcuni deficit cognitivi non siano causati solamente da danni ad una specifica area, ma dall'interruzione delle connessioni, dovute a lesioni della materia bianca e delle aree associative [8].

Gli anni successivi furono caratterizzati dall'avvento di nuove tecnologie che permisero una nuova tipologia di approccio, il neuroimaging. L'ipotesi consisteva nei cambiamenti di flusso di sangue, consumo di ossigeno e utilizzo di glucosio in relazione ad un aumento locale di attività cellulare nell'encefalo. Il monitoraggio di

queste variazioni era possibile grazie all'utilizzo delle tecniche PET¹ e fMRI² [35]. La PET fu utilizzata per dimostrare che un aumento dell'attività cerebrale porta ad un incremento del flusso sanguigno e dell'utilizzo di glucosio, mentre il livello di ossigeno utilizzato rimane invariato. Il risultato, dunque, è la grande abbondanza di sangue ossigenato, caratterizzato da un basso livello di deossiemoglobina (HbR) [11]. Quest'ultima ha proprietà paramagnetiche, a differenza della sua versione ossigenata, quindi può essere utilizzata come agente di contrasto nella MRI [46]. Gli esperimenti di Sieji Ogawa e del suo laboratorio consentirono di sviluppare questa idea fino ad arrivare alla formulazione del BOLD³, ovvero il segnale MRI che varia in base al rapporto tra il livello di emoglobina ossigenata e quella deossigenata [29]. La figura 5.2 riporta gli esperimenti svolti su dei topi, i quali erano costretti a respirare in due condizioni di ossigenazione diverse, la prima in condizioni normali (21% ossigeno), mentre la seconda in condizioni di estrema ossigenazione (100% ossigeno). Si nota infatti che nella prima prova, essendo presente anche dell'emoglobina deossigenata, si ha un contrasto che evidenzia le vene in maniera scura. Nella seconda prova, invece, avendo solamente emoglobina ossigenata, l'immagine risulta chiara senza presenza di vene.

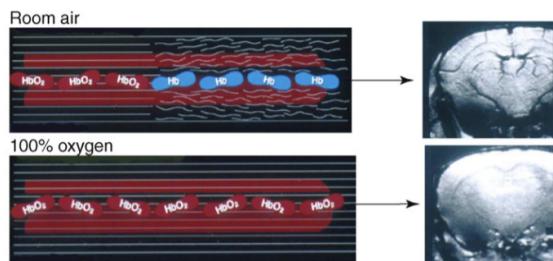


Figura 5.2: Esperimenti di Sieji Ogawa - 1992 [29]

Tutti questi strumenti permettevano di studiare le attivazioni cerebrali durante compiti cognitivi, dimostrando che ognuno di essi richiedeva il coinvolgimento di più aree interconnesse. Tutto ciò pose le basi per il lavoro di Thomas Yeo del 2011, il quale si era prefissato l'obiettivo di realizzare una mappa utilizzabile come riferimento per comprendere meglio le reti corticali e la loro forza di connessione. Il suo studio si basò sul raccoglimento di dati fMRI di 1000 soggetti durante lo stato

¹PET = *Positron Emission Tomography*

²fMRI = *Functional Magnetic Resonance Imaging*

³BOLD = *Blood Oxygen Level Dependent*

di riposo. Successivamente, questi dati vennero analizzati tramite clustering con l'idea di raggruppare aree corticali che presentavano profili di connettività simile. La corteccia è stata semplificata considerandola come un insieme di 18,715 vertici, ovvero punti spaziali in cui è stata registrato il segnale fMRI, in seguito sono stati presi 1,175 vertici ROI⁴ come punti di riferimento, con i quali è stato calcolato il coefficiente Pearson di correlazione per ogni vertice della corteccia. L'ultimo passaggio prevedeva l'applicazione di un algoritmo di clustering che restituì due parcellizzazioni, diverse nella risoluzione. La parcellizzazione a 7 network e quella a 17 network. I network più famosi e utilizzati come riferimento nella letteratura sono quelli della parcellizzazione con risoluzione minore. Essi sono visibili nella figura 5.3: visual (viola), somatomotor (blu), dorsal attention (verde), ventral attention (fucsia), limbic (crema), frontoparietal (arancione) e default (rosso).

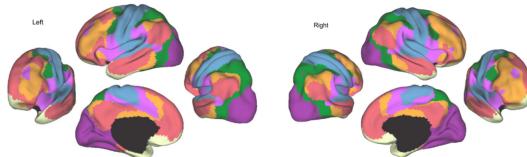


Figura 5.3: Parcellizzazione a 7 network - 2011 [52]

I risultati ottenuti mostrano che la maggior parte della corteccia cerebrale umana è organizzata in reti distribuite su larga scala, composte da regioni funzionalmente connesse ma spazialmente distanti. Analizzando l'intera superficie corticale, gli autori hanno evidenziato che queste reti non sono separate, bensì interdigitate, con zone di convergenza particolarmente complesse nelle cortecce parietale e prefrontale. I risultati suggeriscono che l'unità funzionale rilevante non sia la singola area corticale, bensì la rete distribuita nel suo complesso, le cui funzioni emergono dall'interazione reciproca tra nodi diversi [27, 14]. Le reti associative, a differenza delle aree sensoriali primarie organizzate in maniera locale e gerarchica, risultano altamente interconnesse, prive di chiari rapporti feedforward/feedback e caratterizzate da una forte espansione nell'uomo rispetto ai primati non umani [52].

Il lavoro svolto da Yeo pose le basi per gli studi successivi. Iniziarono, infatti, a nascerne approcci multimodali per la realizzazione di nuove parcellazioni della corteccia cerebrale, garantendo quindi una maggiore risoluzione. Nel 2010 nacque il progetto intitolato "*Human Connectome Project*" (HCP) che include una serie di tecniche di

⁴ROI = *Regions Of Interest*

imaging utilizzate insieme per la realizzazione di un atlante più dettagliato. Tra cui la dMRI⁵, fMRI a riposo, fMRI durante un task e mappatura della mielina [48]. Questo progetto portò alla realizzazione di un atlante caratterizzato da un'elevatissima risoluzione, 180 aree per emisfero [13]. In questo modo, si è affermata una nuova disciplina autonoma, detta *Network Neuroscience*, che permise di integrare le conoscenze ottenute con le nuove tecnologie di imaging, insieme a potenti strumenti matematici presi dalla scienza delle reti, per ottenere un quadro più completo del cervello umano e delle sue infinite funzioni [4].

5.3 EEG per l'Analisi dei Network

Le varie tecniche precedenti garantiscono un'ottima risoluzione spaziale dei vari network, ma non possono fare lo stesso a livello temporale poichè si basano sui movimenti del flusso sanguigno. Questa mancanza può essere colmata dall'utilizzo di altre tecniche non-invasive, l'elettroencefalografia (EEG) e la magnetoencefalografia (MEG), le quali permettono di misurare l'attività elettrica dei neuroni nell'ordine inferiore al millisecondo [28].

5.3.1 Problema Inverso - Ricostruzione dello Spazio Sorgente

Il vantaggio della risoluzione temporale elevata deve scontrarsi con il problema della ricostruzione dello spazio sorgente. Infatti, il segnale prelevato sullo scalpo non corrisponde direttamente alla reale attività interna del cervello, infatti, come visto nel capitolo 3, un elettrodo non è in grado di localizzare un singolo neurone, ma preleva un segnale dato da diversi contributi cerebrali che interferiscono tra di loro. L'obiettivo iniziale, quindi, consiste nella risoluzione di un problema inverso, dalla registrazione EEG/MEG si risale all'attività cerebrale interna esatta, partendo dall'ipotesi che diverse configurazioni dello spazio sorgente possano dare la stessa distribuzione di potenziale o campo magnetico sullo scalpo [10]. L'accuratezza della soluzione è influenzata da diversi fattori riguardanti le modalità di prelievo. Gli elementi principali sono il numero di elettrodi e la loro distribuzione per campionare lo spazio dello scalpo, infatti un numero maggiore di elettrodi permette una localizzazione più accurata delle sorgenti, tenendo però conto che il rumore aumenta e quindi

⁵dMRI = *Diffusion Magnetic Resonance Imaging*

deve essere trattato adeguatamente. In particolare, uno studio condotto prima in simulazione e poi su pazienti epilettici ha dimostrato che il numero di elettrodi permette di abbassare notevolmente l'errore di localizzazione quando si passa da pochi elettrodi a circa 60, dopodichè si giunge ad una fase di plateau, ovvero aumentando il numero non si migliora significativamente l'accuratezza della stima [23]. Inoltre, è fondamentale che il campionamento della testa sia uniforme. Nel caso in cui si abbiano pochi elettrodi a disposizione conviene comunque distribuirli in modo tale da coprire tutto lo scalpo per evitare problemi di aliasing spaziale [28]. L'altro fattore che bisogna tenere in considerazione è la scelta del riferimento. In questo caso la situazione è meno complicata, infatti la distribuzione del potenziale si può definire indipendente dal riferimento poichè l'unica differenza che si potrebbe ottenere in base alla scelta fatta consiste nell'aggiunta di una costante, la quale deve essere rimossa per garantire la quasi stazionarietà del segnale durante l'applicazione di algoritmi di risoluzione del problema inverso. La scelta migliore in questi casi prevede di scegliere come riferimento la media del potenziale registrato sullo scalpo [25].

La risoluzione del problema inverso è formulata nella seguente maniera:

$$\phi(t) = K(R, Q)j(t) + n(t) \quad (5.1)$$

Il termine $\phi(t)$ rappresenta il potenziale elettrico registrato tramite EEG, $K(R, Q)$ è la matrice di *lead field* che mette in relazione lineare il profilo di attivazione delle varie sorgenti, poste in posizione R con orientamento Q , con gli elettrodi, tenendo conto degli strati e delle differenti conduttività che compongono l'interno del volume di prelievo; $j(t)$ è il profilo di attivazione di ogni sorgente ad ogni istante di tempo ed infine $n(t)$ corrisponde al rumore. L'obiettivo del problema, dal punto di vista matematico, consiste nel ricavare $j(t)$ avendo $\phi(t)$ [40]. Inizialmente, a meno di vincoli decisi a priori, non si hanno informazioni sul numero esatto di sorgenti che si vogliono ricavare, ma si sa che sicuramente sono in numero maggiore rispetto agli elettrodi a disposizione, per questo motivo si affronta un problema altamente sottoderminato in cui non è possibile trovare un'unica soluzione esatta ma si cerca di risalire a quella migliore attraverso assunzioni e parametri di regolarizzazione per trattare adeguatamente le problematiche introdotte dal rumore [28]. In letteratura esistono diversi algoritmi per la risoluzione del problema, ognuno dei quali differisce per i vincoli imposti, che possono essere sia puramente matematici che fisiologici. Uno degli algoritmi principali è basato sulla minimizzazione della norma L2 (MN), ovvero si prediligono soluzioni in cui la distribuzione di sorgenti debba avere energia

complessiva minima [17]. Matematicamente è formulata nel seguente modo:

$$\hat{j}(t) = T\phi(t) = TKj(t) + Tn(t) \quad (5.2)$$

in cui la matrice T che permette di invertire la soluzione è data da:

$$T = K^T (KK^T + \lambda I)^{\dagger} \quad (5.3)$$

dove \dagger è un simbolo usato per indicare la pseudoinversa di Moore-Penrose, mentre λ corrisponde al parametro di regolarizzazione richiesto per trattare correttamente il rumore [40]. Ogni algoritmo però ha i propri vantaggi e i propri limiti, ad esempio la stessa stima MN predilige soluzioni superficiali portando ad un'errata localizzazione delle sorgenti, infatti sorgenti posizionate in profondità possono essere erroneamente localizzate superficialmente. Per questo motivo nuovi algoritmi sono realizzati in continuazione, alla ricerca di una soluzione migliore. Uno dei più famosi è chiamato LORETA, che sta per "*Low Resolution Electromagnetic Tomography*". Dal punto di vista fisiologico si impone il vincolo che i neuroni vicini abbiano attività sincronizzata [31], ciò vuol dire che si cerca una soluzione che sia la più "liscia" possibile, le aree quindi devono essere rappresentate con meno dettagli possibili, ovvero a risoluzione bassa. Dal punto di vista matematico si utilizza come misura di rugosità il Laplaciano delle sorgenti pesate, dunque minore sarà il Laplaciano, più liscia e, quindi migliore, sarà la soluzione per questo algoritmo [28]. Una modifica dell'algoritmo LORETA prevede una fase di standardizzazione che porta alla formulazione della versione sLORETA⁶. L'obiettivo principale è limitare il bias di superficialità introdotto dalla stima MN, ovvero la mancata localizzazione delle sorgenti più profonde. La standardizzazione viene effettuata attraverso la varianza della stima \hat{J} . Si inizia considerando che la varianza (S_J) a priori delle sorgenti sia unitaria (matrice identità), cioè che siano indipendenti tra loro. Successivamente si considera la varianza causata dal rumore, considerata come rumore bianco centrato tramite l'operatore H al riferimento medio:

$$S_{\phi}^{noise} = \lambda H \quad (5.4)$$

In questo modo si può scomporre la varianza del potenziale prelevato sullo scalpo:

$$S_{\phi} = KS_JK^T + S_{\phi}^{noise} = KK^T + \lambda H \quad (5.5)$$

⁶s = standardized

5.3. EEG per l'Analisi dei Network

Da questa si ottiene la varianza della corrente stimata tramite l'operatore inverso T , espresso nell'equazione 5.3:

$$S_j = TS_\phi T^T = K^T [KK^T + \lambda H]^\dagger K \quad (5.6)$$

Nel caso di risoluzione tramite stima MN non si ottiene mai la distribuzione J esatta, ma solamente la stima. Si può esprimere la differenza tra le due tramite la matrice di risoluzione R :

$$\hat{J} = RJ \quad (5.7)$$

In questo caso è possibile dimostrare che la matrice R corrisponda esattamente alla matrice di covarianza stimata S_j . Il metodo sLORETA applica la matrice di varianza stimata ad ogni voxel⁷ normalizzandoli singolarmente:

$$J_l^{sLORETA} = \hat{J}_l^T \{[S_j]_u\}^{-1} \hat{J}_l \quad (5.8)$$

Questo passaggio è fondamentale per garantire l'assenza di bias di superficialità, almeno nel caso ideale [32].

Gli algoritmi a disposizione sono numerosi, non esiste il migliore in assoluto ma ognuno si adatta meglio ad una specifica condizione di analisi. In letteratura sono state confrontate le loro prestazioni tramite test che prevedono la creazione di un modello dell'encefalo con alcuni dipoli sparsi nello spazio sorgente. Si genera quindi una distribuzione del potenziale sullo scalpo e successivamente si ricostruisce lo spazio sorgente. L'accuratezza dell'algoritmo viene definita in base a quanto si discosta dal modello iniziale. In uno studio ad esempio, sono stati confrontati alcuni di essi, tra cui LORETA, ed è stato dimostrato che, proprio quest'ultimo, dipende fortemente dal rumore dei dati, quindi viene sottolineata l'importanza di una regolarizzazione accurata per evitare errori di localizzazione [34].

Ogni algoritmo ha come elemento fondamentale la matrice di lead field (la matrice K nell'equazione 5.1), che può essere definita come la rappresentazione matematica dell'encefalo. La matrice ha le seguenti dimensioni $K \in \mathbb{R}^{N_E \times (3N_V)}$ e la struttura:

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} \mathbf{k}_{1,1} & \mathbf{k}_{1,2} & \cdots & \mathbf{k}_{1,N_V} \\ \mathbf{k}_{2,1} & \mathbf{k}_{2,2} & \cdots & \mathbf{k}_{2,N_V} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbf{k}_{N_E,1} & \mathbf{k}_{N_E,2} & \cdots & \mathbf{k}_{N_E,N_V} \end{pmatrix}$$

⁷Con voxel si intende il punto sorgente

nella quale ogni elemento $k_{i,j} \in \mathbb{R}^{1 \times 3}$ con $i = 1 \dots N_E$ ⁸ e $l = 1 \dots N_V$ ⁹ è un vettore formato da tre componenti per tenere conto anche delle tre direzioni x, y e z. L'elemento $k_{1,3}^x$, ad esempio, è il potenziale elettrico sullo scalpo registrato sull'elettrodo numero 1 a causa della sorgente posizionata al voxel numero 3 e orientata in direzione x [32]. La precisione di un algoritmo deriva dall'accuratezza con cui è realizzata la matrice K, poiché al suo interno contiene informazioni elettromagnetiche e geometriche del modello della testa. In letteratura sono stati realizzati molti modelli, con i quali però bisogna sempre fare un compromesso. Un modello molto dettagliato, magari realizzato attraverso metodi BEM¹⁰ o FEM¹¹, garantisce una localizzazione delle sorgenti molto precisa ma ad un costo computazionale decisamente elevato, rispetto invece a modelli più semplici come il classico modello a sfera con proprietà uniformi in tutto il volume oppure il modello a gusci sferici con le caratteristiche che variano da un guscio all'altro [28].

Una volta scelto il modello per la testa, è necessario fare qualche considerazione riguardo al segnale EEG registrato. Un tracciato può durare anche decine di minuti e, considerando una frequenza di campionamento di circa 5000 Hz, significherebbe avere minimo 3 milioni di punti per ogni singolo canale, ovvero un'enorme quantità di dati che aumenterebbero il costo computazionale degli algoritmi di ricostruzione. L'approccio preferito in queste situazioni consiste nella ricerca degli ERP¹², cioè si vanno a selezionare gli istanti di tempo in cui si verifica un determinato evento, come un picco, in relazione ad uno stimolo motorio o cognitivo.

5.3.2 Analisi della Connettività

Una volta ricavato lo spazio sorgente ed estratte le serie temporali relative ad ogni nodo, si può passare all'analisi della connettività, che può essere suddivisa in tre rami: strutturale, funzionale ed effettiva. La connettività strutturale, può essere definita come l'insieme di fibre, quindi materia bianca, che collega ogni parte del sistema nervoso, la cui analisi viene svolta tramite tecniche come MRI e DTI¹³. La connettività funzionale e quella effettiva richiedono un'altra risoluzione temporale ed

⁸ N_E = numero elettrodi

⁹ N_V = numero di voxel/sorgenti

¹⁰BEM = *Boundary Element Method*

¹¹FEM = *Finite Element Method*

¹²ERP = *Event-Related Potentials*

¹³DTI = *Diffusion Tensor Imaging*

è per questo motivo che possono essere analizzate tramite registrazioni EEG/MEG. La prima riguarda la relazione temporale tra segnali di regioni cerebrali anche distanti tra loro, l'altra, invece, si spinge un po' oltre verificando anche la direzione delle connessioni e la loro dinamica [38]. Un esempio potrebbe essere il seguente: si hanno due regioni cerebrali, A e B, di cui si può studiare se esiste una certa relazione temporale (connettività funzionale) oppure si cerca di capire se è A ad influenzare B o viceversa (connettività effettiva) [40].

In letteratura esistono diversi approcci, i quali si distinguono secondo tre criteri: linearità, tipologia di stima e dominio di analisi. I metodi lineari si basano sull'assunzione che la dipendenza tra due segnali possa essere descritta come una combinazione lineare dei valori passati o correnti, mentre i metodi non lineari mirano a catturare relazioni più complesse e caotiche, non riconducibili a semplici proporzioni. La distinzione tra parametrici e non parametrici riguarda invece la tecnica di stima: i primi richiedono la definizione di un modello matematico con parametri da stimare, come nel caso dei modelli autoregressivi, mentre i secondi non presuppongono un modello specifico e stimano direttamente le dipendenze a partire dai dati, come avviene nella correlazione, nella coerenza o nel phase-locking value. In generale, i metodi parametrici sono utilizzati più frequentemente nello studio della connettività effettiva, poiché permettono di stimare la direzionalità e la causalità delle interazioni tra aree cerebrali, mentre i metodi non parametrici trovano maggiore impiego nell'analisi della connettività funzionale, in quanto descrivono le dipendenze statistiche senza imporre vincoli modellistici. Infine, ciascun metodo opera in un dominio differente: alcuni lavorano nel dominio del tempo, altri nel dominio della frequenza, mentre altri ancora, come lo short-time Fourier coherence (STFC) e la wavelet coherence (WC), combinano entrambi gli approcci e agiscono nel dominio tempo-frequenza. Un'ultima distinzione riguarda i metodi "*model-based*" e "*data-driven*". I primi necessitano di assunzioni fisiologiche sul comportamento neuronale per definire un modello biofisico, quindi richiedono una conoscenza profonda della materia, mentre i secondi permettono di svolgere analisi senza avere a disposizione conoscenze a priori sulla struttura [38].

Connettività Funzionale

La connettività funzionale può essere analizzata utilizzando metodi non parametrici, i quali possono essere lineari o non. Nel dominio del tempo è spesso utilizzato il

termine correlazione per valutare le connessioni lineari tra regioni cerebrali. I metodi più comuni sono la cross-correlazione (5.9) e il coefficiente di correlazione di Pearson (PCC) (5.10), la cui differenza consiste nel non tenere conto del ritardo τ tra i segnali. Le equazioni 5.9 e 5.10 mostrano il calcolo dei coefficienti:

$$\rho_{xy}(\tau) = \frac{E[(x - \mu_x)(y - \mu_y)]}{\sigma_x \sigma_y} \quad (5.9)$$

$$\rho_{xy} = \frac{E[(x_n - \mu_x)(y_{n+\tau} - \mu_y)]}{\sigma_x \sigma_y} \quad (5.10)$$

dove x e y sono i segnali, μ_x e μ_y i valori medi e infine σ_x e σ_y le rispettive deviazioni standard. Il valore del coefficiente calcolato nella 5.10 può variare tra -1 e 1, indicando rispettivamente una correlazione negativa o una correlazione positiva [49]. Il legame tra i segnali può essere anche valutato nel dominio della frequenza attraverso la PSD¹⁴ e la coerenza, in particolare la magnitude squared coherence (MSC) e la parte immaginaria della coerenza (IPC). La coerenza viene calcolata nel seguente modo (rispettivamente equazioni 5.11):

$$C_{xy} = \frac{S_{xy}(f)}{\sqrt{S_{xx}(f)S_{yy}(f)}} \quad (5.11)$$

in cui S_{xx} e S_{yy} sono rispettivamente le PSD dei segnali x e y, mentre S_{xy} è la PSD incrociata. La MSC viene calcolata elevando al quadrato ciò che si ottiene dalla 5.11:

$$MSC_{xy}(f) = C_{xy}^2 = \frac{S_{xy}(f)^2}{|S_{xx}(f)| \times |S_{yy}(f)|} \quad (5.12)$$

Inoltre, per evitare problemi dati dalla presenza volume conduttore, in alcuni casi si preferisce valutare la parte immaginaria della 5.9 [49]. Tuttavia, la coerenza non può dare informazioni sul legame reale tra i due segnali, ma solamente sulla sua stabilità. Quindi, se la potenza o la fase di uno dei due segnali cambia, allora anche la coerenza cambia. Il valore di MSC infatti può variare da 0, che significa nessuna stabilità di legame, a 1, massima stabilità [38]. Il calcolo della coerenza purtroppo richiede che i segnali siano stazionari, limitandone quindi l'utilizzo. All'interno della categoria dei metodi non lineari esistono approcci che hanno come obiettivo la ricerca della sincronizzazione tra elementi cerebrali, valutata soprattutto tramite analisi della fase dei segnali. In alcune situazioni, come task cognitivi o patologie, i segnali cerebrali

¹⁴PSD = Power Spectral Density

potrebbero entrare per un breve periodo di phase-locking, ovvero la fase relativa tra i due segnali rimane costante: picchi e valli rimangono allineati [22]. La maggior parte di questi metodi quindi permettono di calcolare dei coefficienti che possano quantificare la sincronizzazione tra le fasi dei segnali. L'idea del phase-locking è rappresentata matematicamente nel seguente modo:

$$|\Phi_x(t) - \Phi_y(t)| = const \quad (5.13)$$

$\Phi(t)$ indica la fase istantanea, calcolata tramite la trasformata di Hilbert:

$$\Phi(t) = \arctan \frac{\tilde{x}(t)}{x(t)} \quad (5.14)$$

Il primo coefficiente utilizzato per valutare la sincronizzazione è il Phase-Locking Value (PLV):

$$PLV = \left| \frac{1}{N} \sum_{j=0}^{N-1} e^{j(\Phi_x(j\Delta t) - \Phi_y(j\Delta t))} \right| \quad (5.15)$$

in cui Δt indica il periodo di campionamento, mentre N il numero di campioni. Il valore varia in un range $[0; 1]$: 0 corrisponde ad una mancanza totale di sincronizzazione, mentre 1 rappresenta la sincronizzazione completa [7]. Questo coefficiente è molto utilizzato perché è indipendente dalla stazionarietà del segnale in esame [38]. Rimanendo nello stesso ambito, è possibile valutare un altro coefficiente, il Phase Lag Index (PLI), che differisce dal PLV poiché non considera la differenza di fase quando è nulla o pari a multipli di π . Una scelta conservativa nei confronti delle connessioni spurie. Infatti, potrebbe capitare che l'attivazione di una sorgente sia sentita da due elettrodi nello stesso istante, questo genererebbe una differenza di fase dei segnali pari a 0 ma la connessione non sarebbe reale. Il calcolo del PLI è il seguente:

$$PLI = |E[\text{sign}(\Delta\Phi(t))]| \quad (5.16)$$

il cui valore può variare, come per il PLV, da 0 a 1: maggiore è l'indice, migliore sarà la sincronizzazione tra i segnali [7].

Tra i metodi non lineari, ne esistono alcuni che si basano sulla stima dell'informazione contenuta nel segnale. Tra questi è bene ricordare la mutual information (MI), che quantifica la dipendenza tra due segnali misurando quanta informazione si riesce a ricavare riguardo ad un segnale attraverso le informazioni contenute nell'altro [38]. Un valore nullo di MI indica l'indipendenza statistica tra le variabili X e Y [43].

Questo metodo ha la caratteristica di essere completamente libero da un modello predefinito, ciò significa che servono poche assunzioni per utilizzarlo [49]. Le equazioni riportate in questa sezione sono ricavate da [38], [7], [49].

5.3.3 Teoria dei Grafi

I metodi precedenti forniscono in output matrici di adiacenza, la rappresentazione matematica della connettività. Esse sono matrici quadrate $A \in \mathbb{R}^{N \times N}$ in cui ciascuna cella a_{ij} riporta la tipologia e la forza di connessione tra la riga i – *esima* e la colonna j – *esima*, le quali corrispondono a sensori, aree corticali, ROI¹⁵ oppure singoli voxels. In base al valore contenuto in ogni cella si possono ottenere matrici binarie in cui si hanno solamente informazioni sulla presenza o meno della connessione, matrici pesate con indicazioni anche sulla forza della connessione e infine matrici direzionali, nelle quali è possibile sapere anche la direzione della connessione.

Una volta ottenuta la matrice di adiacenza, si può trasformare in un grafo tramite, appunto, la teoria dei grafi, una branca della matematica risalente al XVIII secolo che permette di studiare e visualizzare chiaramente la struttura e le funzioni di tutti quei sistemi che si basano sull’interazione tra i propri elementi [41]. Un network cerebrale rientra in questa categoria e quindi può essere modellizzato attraverso i componenti principali di un grafo: i nodi e gli archi. La figura 5.4 riporta l’esempio di un semplice grafo i cui archi non mostrano la direzionalità della connessione, per questo motivo viene definito non-orientato.

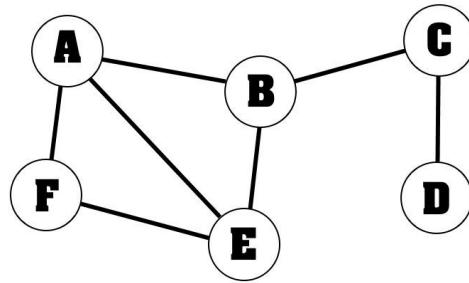


Figura 5.4: Grafo non-orientato

Nella maggior parte dei sistemi cerebrali i nodi sono definiti a priori grazie all’utilizzo

¹⁵ROI = Region of Interest

di template anatomici o funzionali e quindi corrispondono a determinate regioni corticali o network, oppure possono rappresentare direttamente il canale del sistema di prelievo utilizzato o il singolo neurone/voxel ottenuto dopo la ricostruzione dello spazio sorgente. Gli archi, invece, dipendono dal metodo applicato per la stima della connettività e quindi si basano interamente sul contenuto delle celle della matrice di adiacenza. Oltre a poter fornire una visualizzazione migliore della rete sotto esame, la teoria dei grafi comprende una serie di metriche che permettono di quantificare l'organizzazione del network: se è efficiente, se è modulare o se sono presenti nodi con un ruolo particolarmente "centrale". Inizialmente si potrebbe valutare se la rete presenta una struttura segregata, cioè si misura quanto essa tenda a formare gruppi altamente connessi per svolgere in maniera specializzata le proprie funzioni [37]. In questo caso i principali indiziati sono il clustering coefficient e la transitivity. Il primo misura la tendenza locale nel formare dei triangoli, ovvero dei piccoli cluster di nodi. Il secondo, al contrario, è una misura globale che quantifica quanti triangoli ci sono nella rete rispetto a quelli possibili, ciò vuol dire che è definito come un numero compreso tra 0 e 1 e più è si avvicina all'unità più la rete è segregata. Una rete cerebrale efficiente però deve essere in grado anche di integrare le varie informazioni che provengono da diverse regioni corticali. Per questo motivo è necessario misurare anche quanto una rete sia integrata. Il concetto fondamentale è il "path", cioè il percorso che meglio rappresenta la via che l'informazione percorre per passare da una zona all'altra [37]. Le metriche principali in questo caso sono il Characteristic Path Length (CPL), definito come la lunghezza media del percorso minimo tra due nodi, e la Global Efficiency (GE), la versione complementare adatta a grafi disconnessi, definita come la media dell'inverso del cammino minimo. Dunque, un valore basso di CPL o alto di GE è indice di una rete altamente integrata. L'ideale di una rete cerebrale sarebbe possedere una struttura che concilia segregazione e integrazione formando un "small-world", quindi tanti cluster che però riescono a comunicare velocemente tra di loro grazie alla presenza di percorsi brevi [37]. Infine, per avere una visione completa della rete, è fondamentale valutare anche l'importanza dei singoli nodi a livello locale, affidandosi a misure di centralità che permettono di identificare la presenza di nodi provincial-hubs, connector-hubs e periferici. Le metriche utilizzate in questa situazione sono il degree che misura quante connessioni forma ogni nodo, il Within-module degree z-score z_i che valuta quanto un nodo è connesso rispetto agli altri all'interno di un cluster e il Participation Coefficient (PC) che quantifica la diversità di connessioni che ogni nodo forma tra i vari cluster presenti

nella rete. I nodi con grado molto alto hanno un ruolo di rilevanza all'interno della rete e quindi vengono definiti hubs. Inoltre se hanno un valore alto di z_i e un basso PC allora rappresentano dei provincial-hubs e sono importanti per la segregazione, infatti hanno molte connessioni all'interno del proprio cluster ma poche connessioni con altri gruppi. Al contrario dei connector-hubs che presentano un PC molto alto e quindi fanno da "ponte" tra diversi cluster favorendo l'integrazione tra le varie regioni cerebrali.

In conclusione, l'approccio basato sulla teoria dei grafi consente di tradurre la complessità del cervello in un linguaggio matematico interpretabile e comparabile. Attraverso la costruzione della matrice di adiacenza e il calcolo delle diverse metriche di rete è possibile descrivere in modo quantitativo sia la capacità del cervello di integrare informazioni provenienti da aree distinte, sia la sua tendenza a organizzarsi in moduli funzionali specializzati. L'analisi congiunta di misure di segregazione, integrazione e centralità fornisce quindi una visione multilivello dell'architettura cerebrale, permettendo di individuare pattern di connettività tipici di un sistema efficiente, bilanciato e caratterizzato da proprietà di tipo small-world, alla base della comunicazione neurale ottimale.

Capitolo 6

Materiali & Metodi

I capitoli precedenti hanno spiegato chiaramente ciò che si pone alla base di questo studio. Una fase preliminare necessaria per comprendere i dettagli che costituiscono questa sezione delle neuroscienze. Nel momento in cui sono state comprese le nozioni necessarie, si è passati alla parte pratica di questo lavoro. Essa è distinta in due fasi: la prima basata esclusivamente sulla raccolta dei dati e quindi comprendente l'utilizzo delle apparecchiature necessarie, la seconda invece, dedicata all'elaborazione dei dati.

6.1 Set-up Sperimentale

La parte sperimentale si è svolta interamente presso l'azienda torinese **GEA Soluzioni S.r.l**, leader in Italia nel mercato delle apparecchiature per le neuroscienze. La possibilità di condurre il lavoro con dispositivi sofisticati e sotto la supervisione di personale qualificato ha reso la raccolta dei dati estremamente accurata.

L'esperimento ha previsto inizialmente la partecipazione volontaria di dieci soggetti sani, quattro ragazze e sei ragazzi, con un'età media di 23 anni, tutti con mano destra dominante. Ognuno di loro ha compilato un questionario di idoneità per verificare il rispetto delle linee guida di sicurezza riportate nei manuali d'uso delle apparecchiature impiegate. Ad esempio, l'assenza di elementi ferromagnetici all'interno del corpo in prossimità del sito di stimolazione magnetica e la mancanza di episodi epilettici nel corso della vita sono condizioni essenziali per garantire lo svolgimento dell'esperimento in totale sicurezza. Successivamente, ciascun partecipante ha firmato un consenso informato, attestando di aver ricevuto una spiegazione dettagliata dell'esperimento a cui stava per sottoporsi.

La preparazione alla parte sperimentale ha richiesto all'incirca un'ora. Inizialmente il soggetto è fatto sedere comodamente su una sedia che dovrebbe garantire il più possibile la stabilità del capo durante tutto il corso dell'esperimento. Per questo motivo è stato utilizzato uno schienale alto e un cuscinetto da viaggio per aiutare il soggetto

a rimanere fermo per più tempo possibile. La prima fase riguarda il montaggio dell'elettroencefalografo. In questo esperimento è stato utilizzato il sistema **eego™** di *AntNeuro*, il quale permette l'elettroencefalografia ad alta densità, disponendo di 128 canali per la registrazione. Per garantire risoluzione spaziale elevata si è deciso di utilizzare 58 canali che coprissero uniformemente la superficie dello scalpo dei soggetti. La cuffia collegata all'elettroencefalografo è riportata nella figura 6.1. Gli elettrodi sono in Ag/AgCl, circondati da silicone. Ciascuno di essi è collegato ad un cavo schermato di lunghezza 1,8 m.



Figura 6.1: Cuffia Utilizzata - Waveguard di AntNeuro

Dopo aver scelto i canali necessari, sono stati preparati i rispettivi elettrodi attraverso l'aggiunta di gel elettrolitico (*Neuragel*) necessario per diminuire il più possibile l'impedenza tra la superficie dell'elettrodo e lo scalpo. Il sistema fornisce sul monitor una misura real-time delle impedenze di ogni canale, evidenziando di colore verde i canali che raggiungono un valore inferiore ai $20k\Omega$, come si può vedere nella figura 6.2.

L'acquisizione è avvenuta impostando una frequenza di campionamento pari a 8 kHz; la scelta è dovuta al fatto che la stimolazione TMS introduce nel segnale componenti ad alta frequenza e, in questo modo, si garantisce il rispetto del teorema di Nyquist, che richiede di campionare ad una frequenza almeno doppia rispetto alla massima contenuta nel segnale. Durante la registrazione, ogni canale è stato impostato con riferimento all'elettrodo "Cpz", mentre l'elettrodo ground (GND) è stato posizionato nella parte posteriore dell'orecchio sinistro, in una zona neutra. La

6.1. Set-up Sperimentale

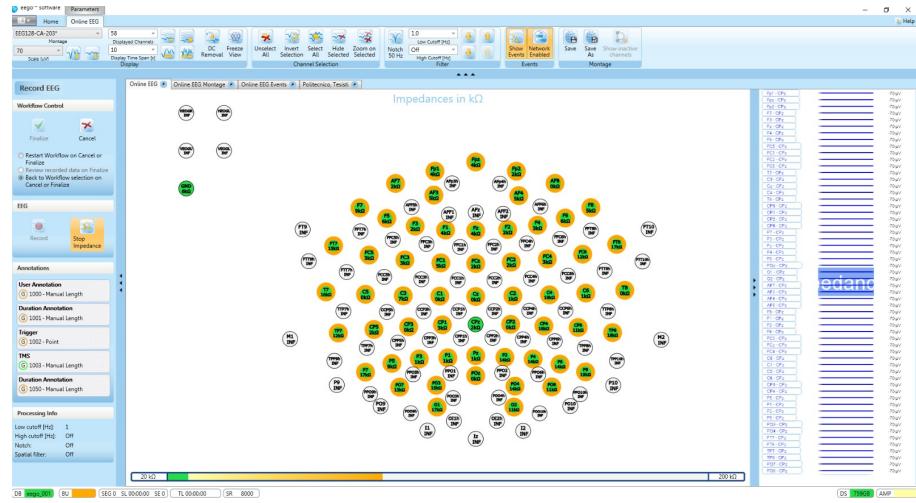


Figura 6.2: Misura Real-Time delle impedenze

figure 6.3 rappresentano la disposizione dei canali con una visualizzazione 2D e 3D (il riferimento non è riportato).

Durante lo svolgimento dell'esperimento è prevista la stimolazione magnetica di un sito specifico della corteccia cerebrale, cioè la corteccia motoria M1 posizionata sul lato sinistro dello scalpo del soggetto, precisamente a metà del cranio, tra il punto più alto della testa e l'orecchio sinistro. Mediamente questa regione è localizzata in prossimità del canale C3, se si vuole avere un riferimento a livello degli elettrodi. La scelta deriva dal fatto che si tratta della regione che garantisce maggiore riproducibilità delle stimolazioni poiché si ha una risposta motoria visibile ad occhio nudo nella mano destra. Infatti, nel momento in cui l'intensità della stimolazione raggiunge la soglia motoria, giunge un input alla mano destra che fa contrarre il pollice. In questo modo è possibile controllare che il sito delle stimolazioni rimanga costante per tutto l'esperimento. La ricerca del punto di stimolazione esatto non è affatto semplice e infatti ha richiesto l'ausilio di un altro dispositivo, il neuronavigatore *TMSNAVIGATOR di LOCALITE*. Esso è in grado di tracciare contemporaneamente la posizione e l'orientamento sia del cranio del soggetto che della bobina stimolatrice grazie ad una telecamera ad infrarossi, la quale riconosce gli oggetti da tracciare attraverso il posizionamento di sfere metalliche riflettenti sullo scalpo del soggetto e sulla bobina, dopo opportuna calibrazione. Attraverso un puntatore da posizionare nei vari punti di repere del soggetto si è ricostruito il modello in coordinate MNI del cervello di ciascun soggetto. Dopo aver calibrato la bobina, in modo tale che sia

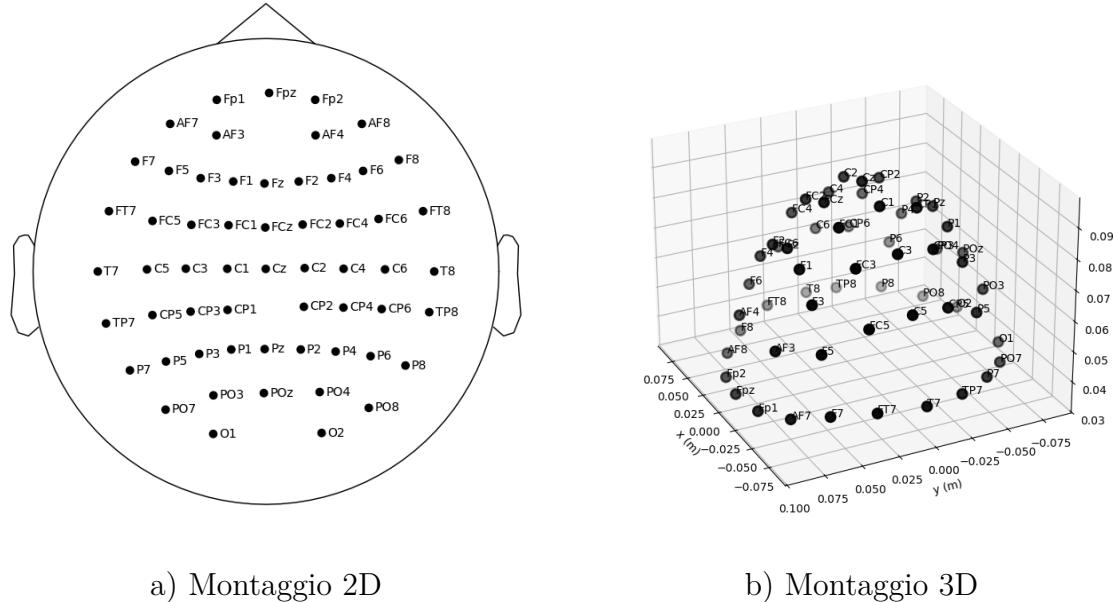


Figura 6.3: Montaggio dei 58 canali utilizzati.

tracciabile dal sistema, il software ha calcolato automaticamente la posizione del sito M1 della corteccia ricostruita, in modo tale da avere un punto di riferimento in cui provare a stimolare. Ciascun sito di stimolazione è stato poi riposizionato per ogni soggetto, cercando la regione che producesse la maggior risposta motoria nel pollice della mano destra. Nel momento in cui è stato trovato il sito ottimale, la bobina è stata fissata tramite braccio meccanico. La figura 6.4 riporta il monitor del neuronavigatore mentre mostra due visuali del modello del cervello ricostruito nella parte superiore e, nel riquadro in basso a destra, il posizionamento della bobina. In particolare, la croce rossa rappresenta la posizione ottimale per la stimolazione in M1, mentre la croce bianca la posizione attuale della bobina. Naturalmente maggiore è la sovrapposizione tra la croce rossa e bianca, migliore è la precisione della stimolazione.

Il passo successivo è stata la ricerca della soglia motoria, svolta secondo le linee guida del manuale d'uso dello stimolatore **MagPro R30** della famiglia *MagPro* di *MagVenture*. La bobina utilizzata è la D-B80, caratterizzata da design a farfalla aperta con un angolo di apertura di 120° per garantire una stimolazione concentrata. L'intensità dello stimolatore è espressa in percentuale dell'intensità massima erogabile. La soglia motoria è stata determinata per ogni soggetto partendo da una certa intensità, pari

6.1. Set-up Sperimentale

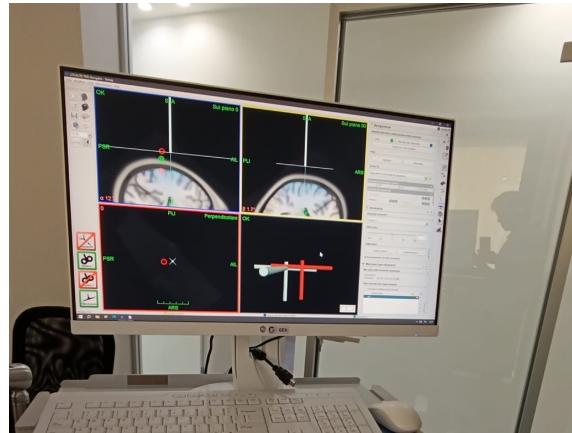


Figura 6.4: Monitor del Neuronavigatore

a circa 50-60% in modo tale da essere sicuri che mostrasse risposta motoria nella mano destra. Sono stati eseguiti cinque stimoli per ogni livello di intensità testato e, nel momento in cui sono state visualizzate almeno tre risposte motorie su cinque, è stata diminuita l'intensità, finché si è giunti ad un livello tale da non garantire più il rispetto della regola; quindi il livello precedente di intensità è stato impostato come soglia motoria del soggetto. La tabella 6.1 riporta le soglie motorie.

Tabella 6.1: Valori di soglia motoria per ciascun soggetto

Soggetto	Soglia motoria (%)
Soggetto 1	41
Soggetto 2	46
Soggetto 3	41
Soggetto 4	39
Soggetto 5	33
Soggetto 6	35
Soggetto 7	47
Soggetto 8	42
Soggetto 9	47
Soggetto 10	48 height

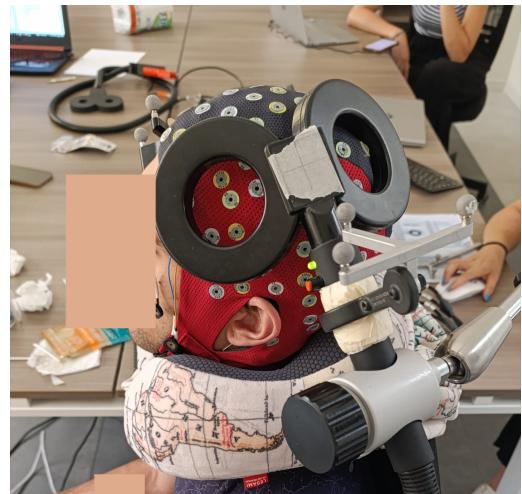
A questo punto è terminata la preparazione all'esperimento. Il passo successivo consiste nell'impostazione del protocollo sperimentale. Sono stati impostati complessivamente cento stimoli sotto-soglia motoria, pari all'80% dell'intensità stimata per

ogni soggetto, ciascuno rilasciato sotto forma di onda bifasica a una distanza di 5 secondi dal precedente, quindi con una frequenza di stimolazione pari a 0,20 Hz, tale da garantire ampiamente il rispetto delle linee guida di sicurezza della stimolazione [36]. I successivi cento stimoli sono stati selezionati con la stessa frequenza di scarica ma con un'intensità pari al 120% della soglia motoria. L'erogazione di questi è avvenuta dopo un minuto di pausa per permettere al soggetto di rilassarsi. Durante tutta l'erogazione, il soggetto ha mantenuto gli occhi aperti fissando una croce bianca, posta ad una distanza di circa 1,5 m. La durata totale del protocollo è di circa 18 minuti, 8 minuti e 19 secondi per ciascuna stimolazione, a cui si aggiunge il minuto di pausa tra le due diverse intensità. Durante lo svolgimento del protocollo, il sistema di acquisizione EEG ha riportato annotazioni sul tracciato ogni volta che è stato erogato uno stimolo, grazie al collegamento diretto tra lo stimolatore e l'elettroencefalografo con un trigger analogico. L'utilizzo di tappi per le orecchie è consigliato per diminuire l'effetto sonoro nel momento di erogazione dello stimolo, il quale potrebbe causare reazioni involontarie nei soggetti.

Le figure 6.5 riportano il set-up completo dell'esperimento, mostrando anche la posizione del soggetto.



a) Set-up esperimento



b) Posizionamento bobina su soggetto

Figura 6.5: Set-up completo.

6.2 Pre-Processing dei dati

Una volta terminata la raccolta dati per i dieci soggetti, una fase dedicata al pre-processing dei dati è essenziale per limitare il più possibile la presenza di tutte le componenti rumorose contenute nei segnali. L'intera elaborazione dei dati è stata svolta in ambiente Python (versione 3.12.7), in particolare utilizzando la libreria MNE, realizzata per l'analisi di segnali EEG e MEG [15].

L'elaborazione ha coinvolto solamente nove soggetti sui dieci a disposizione poichè un tracciato è risultato non interpretabile. Il pre-processing dei dati raccolti è una delle fasi principali di tutta la parte sperimentale poichè determina la correttezza dell'analisi. La presenza della stimolazione magnetica ha richiesto una serie di accorgimenti durante lo svolgimento. Inizialmente è stato osservato il segnale grezzo per individuare i canali da marcare per un'eventuale interpolazione spaziale, infatti, potrebbe capitare che alcuni canali non abbiano registrato attività. Lo stimolo magnetico ha reso la visualizzazione estremamente difficoltosa poichè la sua ampiezza oltrepassava decisamente la dinamica del segnale EEG, come si può vedere nella figura 6.6.

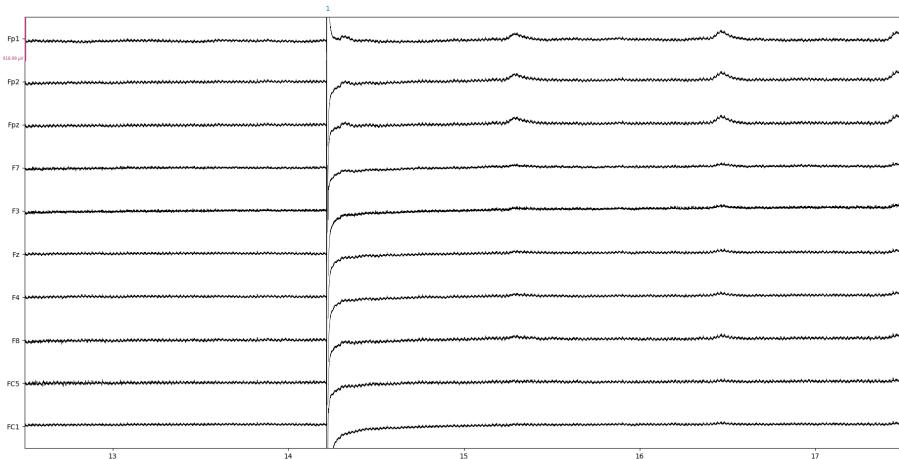


Figura 6.6: Rappresentazione grezza del segnale con stimolazione intorno al quattordicesimo secondo.

Per questo motivo si è deciso di limitare questa presenza eliminando una finestra temporale intorno ad ogni stimolo, precisamente da 2 ms prima a 20 ms dopo, sostituendola poi con un'interpolazione lineare tra l'ultimo campione rimasto prima dello stimolo e il primo dopo la finestra rimossa. La figura 6.7 mostra il risultato

ottenuto.

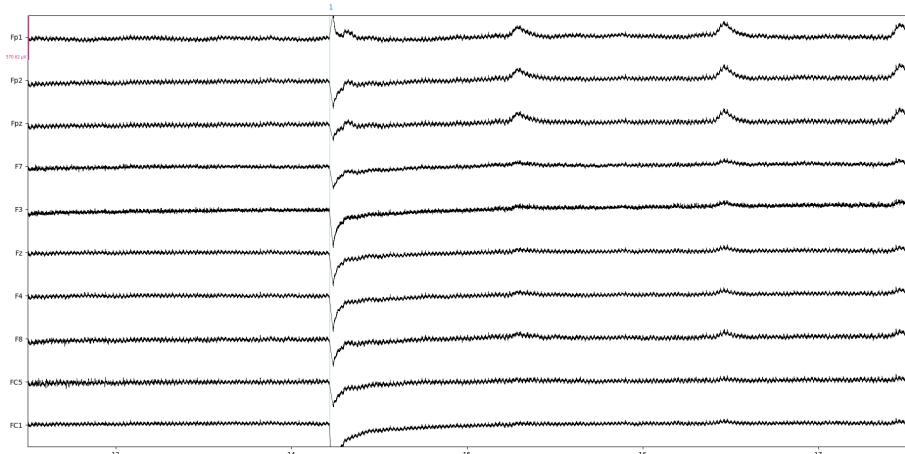


Figura 6.7: Rappresentazione grezza del segnale con artefatto rimosso tramite interpolazione lineare.

In questa situazione, si è optato per la segmentazione del segnale, grazie alla presenza degli eventi aggiunti sul tracciato dal trigger analogico, selezionando 100 epoche sotto-soglia motoria e 100 sopra-soglia, dalla durata complessiva di 3,7 secondi ciascuna, cioè un intervallo temporale compreso tra 200 ms prima dello stimolo e 3,5 secondi dopo. La figura 6.8 mostra i tracciati ottenuti concatenando le varie epoche. Il mantenimento di un intervallo pre-stimolo è necessario per avere una baseline da utilizzare successivamente nel calcolo della matrice di covarianza del rumore, un passaggio fondamentale durante la ricostruzione dello spazio sorgente. L'utilizzo di uno stimolatore magnetico introduce nel segnale registrato un artefatto molto invasivo che, data l'intensità, copre gran parte del segnale cerebrale. Per questo motivo è stata presa la decisione di analizzare epoche che partissero da 150 ms dopo ciascun evento, perdendo consapevolmente la possibilità di analizzare direttamente i potenziali evocati dalla stimolazione (TEP) ma preferendo un'analisi diretta all'intervallo subito successivo.

Avendo rimosso la componente principale dello stimolo, la pulizia dei dati è proseguita eseguendo inizialmente un ricampionamento a 1000 Hz per alleggerire i segnali. Successivamente seguito da un filtraggio preliminare passa-banda tra 2.5 Hz e 100 Hz, al fine di eliminare i trend residui dovuti alla stimolazione e le componenti ad alta frequenza, e da un filtro notch per limitare l'interferenza di rete a 50 Hz. Entrambi i filtri sono stati progettati di tipologia fir a doppia passata e finestra di Hamming.

6.2. Pre-Processing dei dati

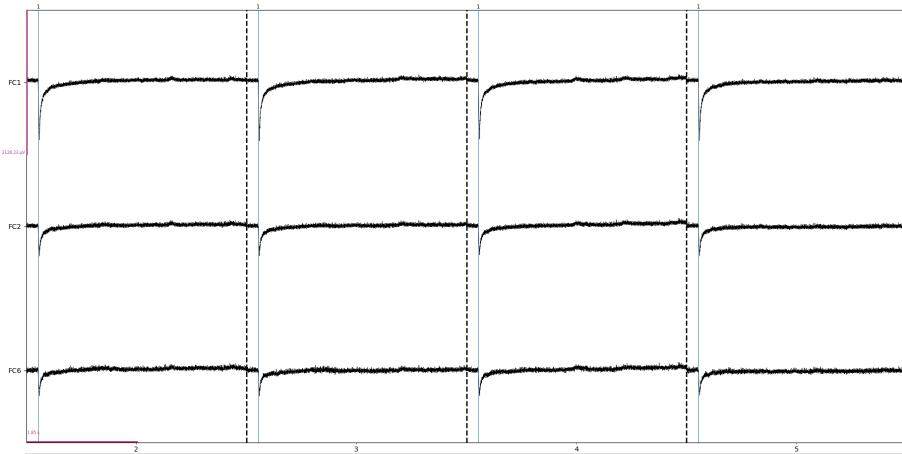


Figura 6.8: Segmentazione del segnale

Tuttavia, l'applicazione dei filtri su segnali segmentati provoca effetti di bordo su ciascuna epoca. Pertanto, prima di procedere con l'ICA, sono stati tagliati i bordi di ciascuna epoca. L'ICA è un passaggio fondamentale nella pulizia del segnale poichè la stimolazione potrebbe aver introdotto componenti che non rappresentano per nessun motivo segnale cerebrale. Sono state estratte 15 componenti indipendenti che massimizzassero l'informazione mutua del segnale. La scelta delle componenti da escludere è stata effettuata combinando controllo visivo delle proprietà e del tracciato di ciascuna componente ed un'etichettatura automatica tramite la funzione *label_components* di *mne_icalabel* che permette di classificare le componenti principali come artefatti muscolari, movimento degli occhi o artefatto cardiaco restituendo un valore che esprime quanto è probabile che quella componente sia di quella tipologia. Ad esempio nella figura 6.9 sono le riportate le caratteristiche di una componente individuata dall'ICA che è stata classificata al 99,6% come movimento oculare e quindi esclusa.

Un primo dato interessante riguarda il numero delle componenti classificate come cerebrali nelle due situazioni di stimolazione. Infatti il sistema ha individuato e classificato un numero maggiore di componenti cerebrali nel segnale con stimolazione sotto-soglia. Questo potrebbe significare che una stimolazione intensa induca una presenza più abbondante di artefatti muscolari. La fase di pre-processing è stata conclusa applicando un ultimo filtraggio passa-basso con frequenza di taglio a 40 Hz per limitare ulteriormente le componenti al di fuori della banda EEG. Le epoche finali sono state ottenute attraverso un taglio dei bordi e rappresentano l'intervallo

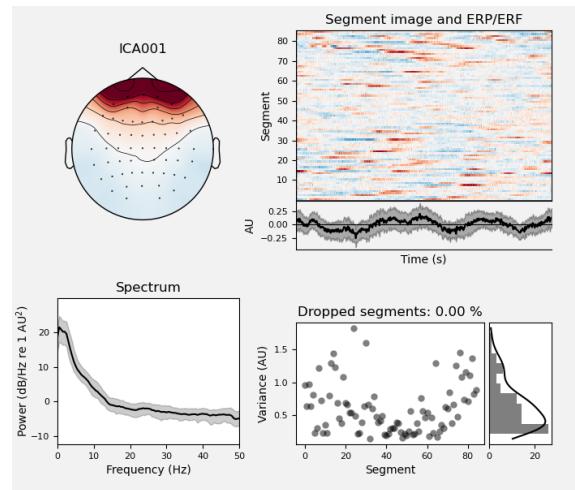


Figura 6.9: Proprietà tipiche di un movimento oculare

compreso tra 0,3 s e 2,3 s dopo ciascuno stimolo. La figura 6.10 mostra i risultati finali del pre-processing.

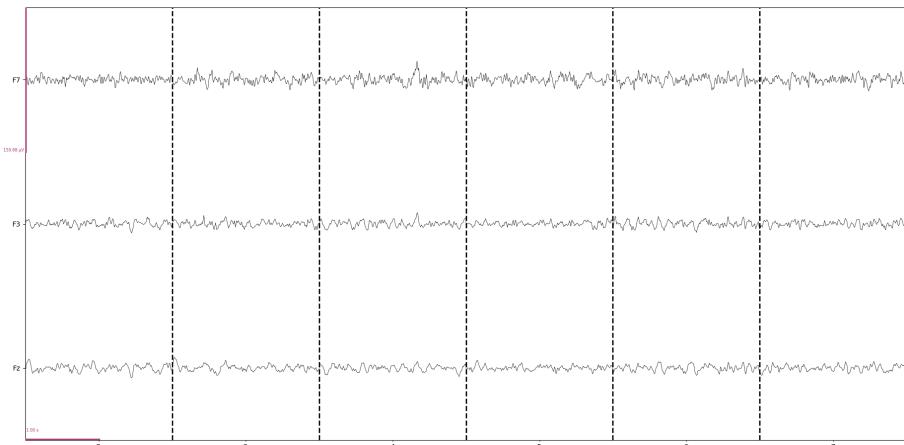


Figura 6.10: Fine Pre-Processing

6.3 Ricostruzione Spazio Sorgente

Lo studio della connettività, come spiegato nella sotto-sezione 5.3.1 del capitolo 5, ha prestazioni migliori se analizzata nello spazio sorgente poiché la possibilità

6.3. Ricostruzione Spazio Sorgente

di avere interazioni spurie cala drasticamente rispetto all’analisi nello spazio dei sensori. Non possedendo la risonanza magnetica di ogni soggetto, per la ricostruzione si utilizza un template chiamato *fsaverage* [12] ottenuto dalla media delle risonanze magnetiche di più soggetti e disponibile nei dataset pre-caricati in MNE. Il modello selezionato fornisce anche altri file: la matrice di trasformazione per passare dal sistema di coordinate EEG al sistema MRI, le posizioni delle sorgenti cerebrali, che in questa situazione sono circa 10000 per emisfero, e infine la soluzione numerica del modello BEM a tre strati necessaria per calcolare la forward solution (matrice di lead-field). Effettuare un’analisi della connettività nello spazio sorgente, avendo a disposizione circa 20000 sorgenti in totale, avrebbe un costo computazionale molto elevato, pertanto è essenziale optare per il raggruppamento delle sorgenti in ROI utilizzando le parcellizzazioni della corteccia disponibili. La scelta è ricaduta sulle parcellazioni a 7 e 17 network di Yeo, citate precedentemente nella sezione 5.2 e riportate nelle figure ?? e 6.12.

Dopo aver scelto la parcellizzazione, è stato possibile calcolare la matrice di lead-field (la soluzione diretta del problema) utilizzando le informazioni contenute nel modello *fsaverage*. Il calcolo della matrice inversa richiede le informazioni relative al montaggio utilizzato durante la registrazione, la forward solution e la matrice di covarianza del rumore, stimata tramite la baseline pre-stimolo salvata precedentemente durante la fase di pre-processing. Questo passaggio è fondamentale per stabilizzare la soluzione inversa e per modellare correttamente il rumore dei sensori. La funzione impiegata per stimare la matrice inversa include inoltre alcuni parametri di regolarizzazione che consentono di impostare l’orientamento delle sorgenti e di controllare il peso delle sorgenti superficiali per evitare che vengano favorite eccessivamente rispetto a quelle profonde. In questo studio si è scelto di mantenere i valori di default della funzione, ottenendo quindi un’orientamento prevalentemente perpendicolare alla superficie dello scalpo. Infine, l’applicazione della matrice inversa ha permesso di ottenere le serie temporali di attivazione delle sorgenti. Anche in questo caso, la funzione mette a disposizione diverse opzioni per la stima della soluzione — MNE, dSPM, sLORETA ed eLORETA — e in questo lavoro è stato adottato il metodo sLORETA, già descritto nella sezione 5.1 e nella formula 5.8. Come spiegato precedentemente, le serie temporali sono stimate per ogni sorgente presente nello spazio ricostruito. Per ridurre il costo computazionale del successivo calcolo della connettività, sono stati quindi estratti i segnali medi di ciascuna ROI della parcellazione in base alle sorgenti a essa associate. In particolare,

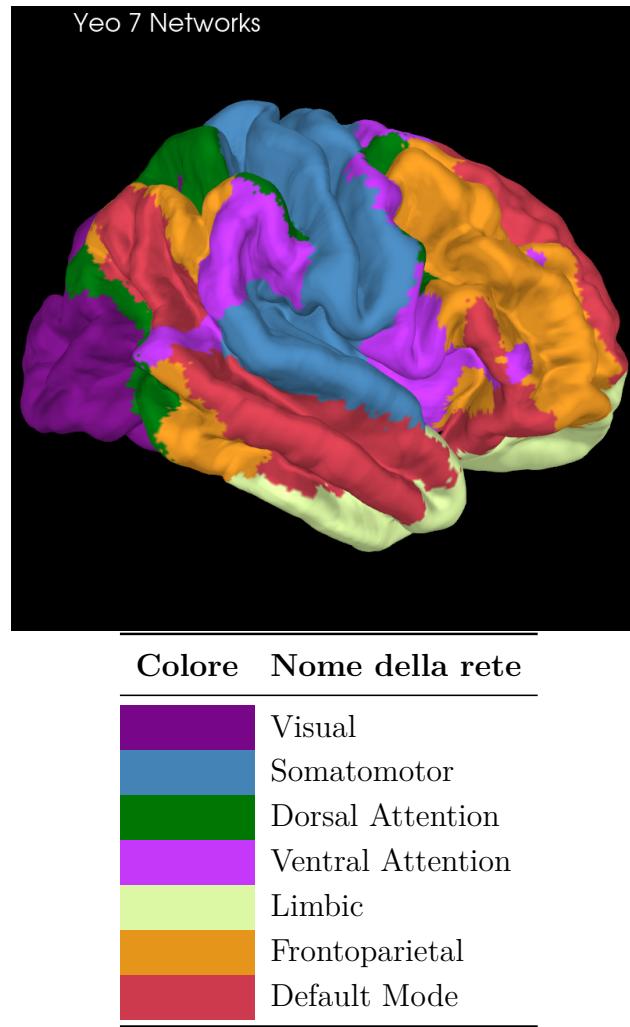


Figura 6.11: Parcellizzazione Yeo 7 Networks: visualizzazione tridimensionale e corrispondenza cromatica dei network [52]

è stato utilizzato il parametro che, prima della media, allinea l'orientamento delle sorgenti così da evitare che un elevato numero di campioni con orientazioni opposte tenda a cancellarsi reciprocamente. Un'alternativa, non adottata in questo studio, consiste nell'utilizzare la PCA¹ delle serie temporali di ogni ROI e selezionare la prima componente principale come rappresentativa della regione. Tuttavia, questa strategia comporta un tempo di calcolo sensibilmente superiore, soprattutto quando il numero di ROI è elevato. Il risultato ottenuto è rappresentato nella figura 6.13

¹PCA = *Principal Componentss Analysis*

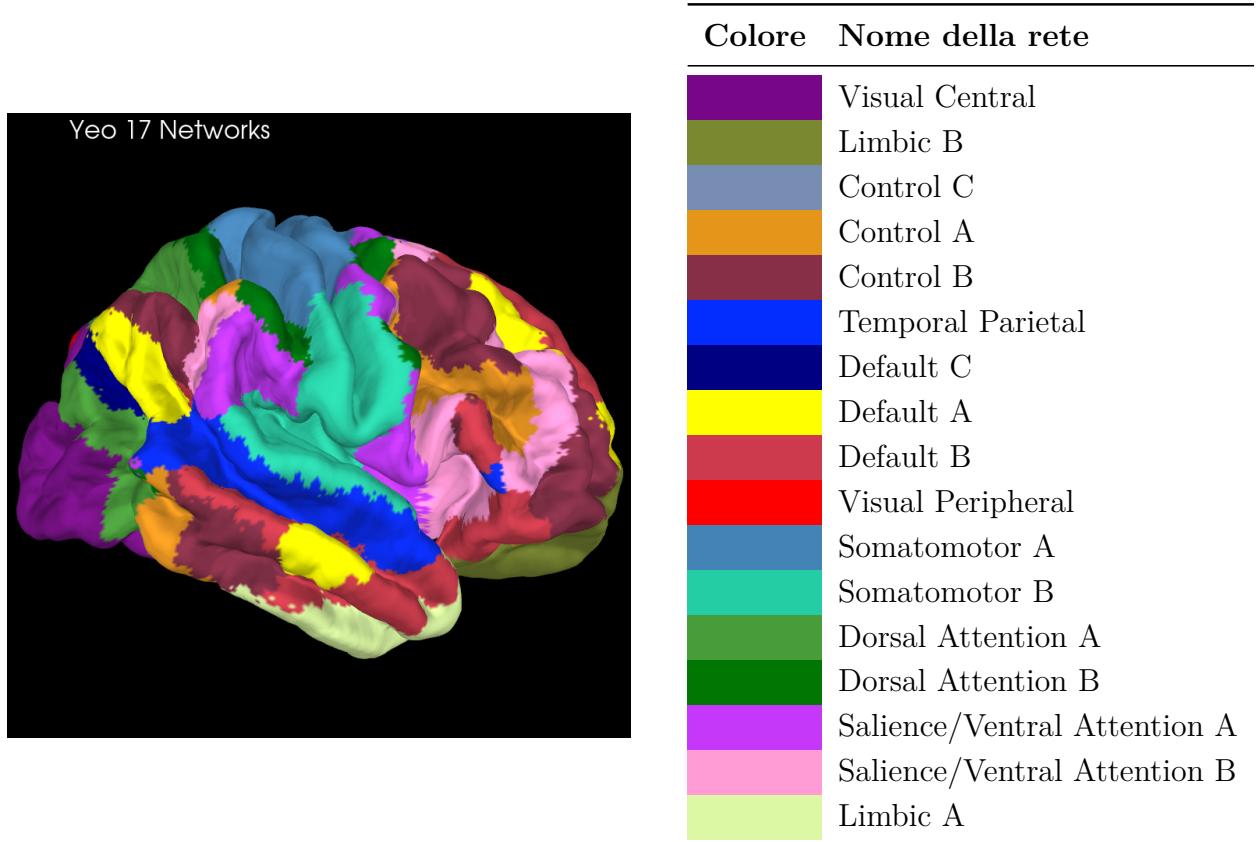


Figura 6.12: Parcellizzazione Yeo 17 Networks: visualizzazione tridimensionale e corrispondenza dei 17 network tramite codifica cromatica [52]

6.4 Calcolo della connettività

Al termine della ricostruzione in spazio sorgente sono state ottenute le serie temporali medie per ciascuna regione della parcellazione. Utilizzando la mappa di Yeo a 7 network si ottengono complessivamente 14 serie temporali (una per ciascuna regione dei due emisferi), mentre con la parcellizzazione a 17 network il numero totale sale a 34.

Tutte le decisioni prese nei passaggi precedenti hanno condotto lo studio ad una serie di problematiche inevitabili. La stima dello spazio sorgente permette sicuramente di migliorare lo studio della connettività che si ottenebbe a livello dei sensori, dato che

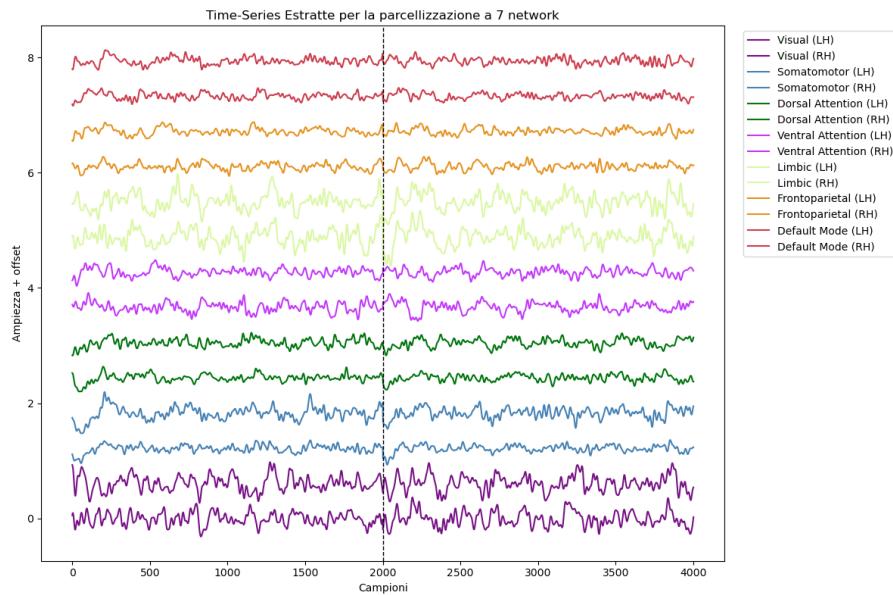


Figura 6.13: Esempio dell'estrazione delle serie temporali per i 7 network di Thomas Yeo (rappresentazione di due epoche concatenate)

ognuno di essi potrebbe registrare l'attività simultanea di un numero sconosciuto di sorgenti. Tuttavia, nessun metodo per risolvere il problema inverso garantisce la perfezione e, infatti, ciascuno dipende fortemente dalle assunzioni fatte durante il calcolo dell'operatore inverso. Il rischio più grande che si corre in questi casi riguarda il leakage tra le varie sorgenti. In poche parole, ogni sorgente, nonostante venga stimata come indipendente, risente dell'attività delle sorgenti localizzate nelle vicinanze. Si potrebbero quindi generare dei falsi positivi che però vanno distinti in due categorie: interazioni artificiali e interazioni fantasma. La causa è sempre il mixing ma il comportamento è differente. Le interazioni artificiali si verificano nel momento in cui una regione molto attiva, "sparge" il proprio segnale anche in alcune regioni vicine che normalmente non sarebbero connesse ma contenendo gran parte dello stesso segnale sono classificate come un'interazione reale erroneamente. Fortunatamente è possibile limitare questa tipologia utilizzando metodi che penalizzano le connessioni a zero-lag. Le interazioni fantasma invece, risultano essere più subdole perché sono il riflesso di interazioni reali ma localizzate in diverse posizioni da quelle originali. Un esempio potrebbe chiarire la situazione. Sono presenti due regioni realmente connesse, A e B, la loro attività si sparge anche in altre due regioni più lontane, originariamente sconnesse, C e D. Nel momento in cui si stima la connettività, A e

B saranno classificate come una vera connessione ma contemporaneamente anche C e D risulteranno come un'interazione reale, nonostante siano in un posto diverso. Il problema serio consiste nella mancanza di un metodo robusto contro queste interazioni fantasma [30]. Nel lavoro svolto è stato scelto di utilizzare come indice di connettività il Phase-Locking-Value (PLV, formula 5.15), spiegato nella sotto-sezione 5.3.2 del capitolo 5. L'indice possiede una propria versione per analizzare la connettività dal punto di vista *trial-based*, cioè analizzando la stabilità della differenza di fase tra diversi stimoli. L'equazione è leggermente diversa:

$$PLV_{ij} = \left| \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N e^{-i(\varphi_i(n) - \varphi_j(n))} \right| \quad (6.1)$$

In questa situazione, N è il numero di epoche o stimoli, mentre $\varphi_i(n)$ e $\varphi_j(n)$ rappresentano le fasi estratte dall'epoca n -esima nella regione i e nella regione j . Pertanto, PLV_{ij} restituisce un valore compreso tra 0 e 1 che indica quanto la differenza di fase tra le due regioni è stabile nel corso dei trial. Tuttavia, il PLV non risulta essere molto performante nei casi reali in cui il leakage del segnale raggiunge valori elevati. Il PLV infatti nel caso in cui due segnali siano esattamente identici con differenza di fase nulla e stabile tra le epoche, restituirebbe un valore molto alto di connessione, anche se effettivamente sarebbe solamente un'interazione artificiale. Per questo motivo, le soluzioni più adottate in letteratura sfruttano la parte immaginaria che dipendendo dal seno della differenza di fase. Infatti, nel momento in cui essa vale 0° o 180° allora restituisce valori di connessione nulli. Pertanto, la versione utilizzata in questo studio è la "*corrected-imaginary part*" del PLV, rappresentata dall'equazione seguente:

$$ciPLV_{ij} = \frac{Im \left\{ \left| \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N e^{-i(\varphi_i(n) - \varphi_j(n))} \right| \right\}}{\sqrt{1 - \left(Re \left\{ \left| \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N e^{-i(\varphi_i(n) - \varphi_j(n))} \right| \right\} \right)^2}} \quad (6.2)$$

Il denominatore dell'equazione 6.2 serve per normalizzare i risultati e ottenere valori compresi tra 0 e 1 [6].

Il calcolo della connettività è stato eseguito utilizzando la funzione specifica della libreria MNE. L'estrazione della fase per ciascuna epoca è avvenuta tramite stima spettrale con metodo *multitaper*. Non è stato analizzato lo spettro completo: ogni banda EEG è stata trattata separatamente, in modo da mantenere una condizione il più possibile a banda stretta. Poiché le oscillazioni in banda beta (13–30 Hz) sono più rapide rispetto a quelle in banda theta (4–8 Hz), si è preferito non utilizzare la stessa

lunghezza d'epoca per tutte le bande. Dunque, si è scelto di applicare un metodo che garantisse la presenza di almeno 10-12 cicli di oscillazione per ogni frequenza centrale di ciascuna banda: 2 s per il ritmo theta, 1 s per il ritmo alfa e 0,66 s per beta. Dato che ogni epoca è stata trattata come un evento indipendente, per alfa e beta, le cui finestre erano inferiori alla durata totale, l'analisi è stata condotta facendo scorrere la finestra della banda all'interno dell'epoca originale. In particolare, per l'alfa sono state estratte due finestre e per la beta tre. In questo modo è stato possibile mantenere lo stesso numero di epoche analizzate per ciascuna banda, pur utilizzando durate differenti.

Il passaggio precedente ha fornito in output una matrice per ogni banda. Come spiegato nella sotto-sezione 5.3.2 del capitolo 5, ciascuna cella della matrice riporta il valore di connessione tra due regioni della parcellazione. Tuttavia, l'indice viene stimato per qualsiasi coppia, quindi difficilmente una cella contiene un valore nullo. Al contrario, ci possono essere valori molto bassi che rappresentano connessioni spurie e rumorose. In letteratura uno dei passaggi cruciali in questa situazione è la scelta riguardante quali connessioni considerare vere e quali false. Nella maggior parte dei casi si opta per una sogliatura in grado di mantenere il $k\%$ dei valori della matrice. Tuttavia, è una scelta arbitraria che potrebbe influenzare notevolmente l'interpretabilità dei risultati. Nel seguente studio, si è deciso di calcolare la soglia da applicare sulla base di segnali surrogati generati per ogni epoca di ciascuna serie temporale delle regioni mantenendo lo stesso spettro in ampiezza, ma scambiando le fasi in maniera randomizzata (eccetto i vincoli richiesti sulla frequenza zero e la fase della componente di Nyquist), ottenendo così una serie temporale priva della struttura di fase originale ma con identica distribuzione spettrale. In particolare, sono stati generati 100 surrogati per ciascuna ROI ed è stata ripetuta la stessa tipologia di analisi della connettività, ottenendo una distribuzione di valori di ciPLV totalmente casuali. La soglia è stata determinata per ogni banda come il massimo dei due 95° percentili delle distribuzioni ottenute, cioè il valore oltre il quale una connessione può essere considerata reale e non frutto di una situazione casuale. Alla fine di questo passaggio di sogliatura si è ottenuta una matrice sparsa, in cui tutte le celle che non rispettavano la condizione imposta sono state azzerate.

Al termine del processo di calcolo della connettività, ciascuna matrice è stata trasformata in un grafo utilizzando la libreria *NetworkX* di Python. Inizialmente sono state valutate metriche globali della rete ottenuta. Ad esempio è stata misurata la forza media delle connessioni, cioè per ogni nodo è stata calcolato il valore

complessivo delle connessioni (intese come stabilità di differenza di fase nel corso dei trial), successivamente sono state sommate tutte insieme e divise per il numero di nodi con almeno una connessione. Un’ulteriore valutazione è stata effettuata sul valore della densità degli archi, cioè il numero di archi che sono riusciti a sopravvivere al passaggio della sogliatura, rispetto al numero totale di archi possibili. È stata aggiunto anche il coefficiente medio di clustering medio come indicatore del livello di segregazione della rete, calcolato nel seguente modo:

$$C^w = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{2t_i^w}{k_i(k_i - 1)} \quad (6.3)$$

In cui $t_i^w = \frac{1}{2} \sum_{j,h \in N} (w_{ij} w_{ih} w_{jh})^{\frac{1}{3}}$ rappresenta la media geometrica dei triangoli intorno al nodo i -esimo, mentre k_i il numero di nodi connessi sempre con il nodo i -esimo. Nel caso in cui k_i è inferiore a 2 allora il coefficiente di clustering per quel nodo risulta essere nullo poichè non è possibile ottenere triangoli intorno. L’ultima metrica globale è rappresentata dalla *global efficiency*, spiegata nella sotto-sezione 5.3.3 del capitolo 5, che nel momento in cui si hanno reti pesate si calcola nel seguente modo:

$$E^w = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \left(\frac{\sum_{j \in N, j \neq i} (d_{ij}^w)^{-1}}{n - 1} \right) \quad (6.4)$$

In cui $d_{ij}^w = \sum_{a_{uv} \in g_{i \rightarrow j}^w} f(w_{uv})$ è la lunghezza del cammino minimo pesato, ottenuta attraverso una trasformazione del valore di connessione. Ad esempio, un valore elevato di ciPLV può essere interpretato come un percorso breve tra due nodi.

L’analisi delle metriche è stata successivamente condotta anche a livello locale, con l’obiettivo di identificare quali nodi mostrassero variazioni in funzione della tipologia di stimolazione, in particolare quali network abbiano aumentato il valore di forza di connessione totale. Nell’ambito dell’analisi dei grafi, le equazioni utilizzate sono state ricavate da una tabella riassuntiva fornita da [37].

Capitolo 7

Risultati & Discussione

7.1 Risultati

Il calcolo della connettività ha fornito in output matrici di adiacenza in cui il colore di ogni cella è indice del valore di connessione tra i due network a cui appartiene. Come spiegato nel capitolo precedente, è stata calcolata una matrice per ogni soggetto, nelle due condizioni di stimolazione, nelle tre diverse bande e utilizzando le due tipologie di parcellizzazioni scelte. Di seguito, nelle figure 7.1 - 7.4, sono riportati alcuni esempi. I primi due gruppi di matrici rappresentano la connettività utilizzando la parcellizzazione di Yeo a 7 network per emisfero, mentre i successivi riportano i risultati ottenuti utilizzando la suddivisione corticale a 17 network.

Le matrici ottenute sono state convertite in grafi e analizzate tramite metriche globali, con l'obiettivo di individuare eventuali differenze significative legate alle diverse tipologie di registrazione. Per ciascuna banda è stato eseguito il confronto di quattro metriche, descritte nella sezione 6.4 del capitolo 6: forza media delle connessioni (*strength*), coefficiente medio di clustering, densità ed efficienza globale. Le figure 7.5-7.7 mostrano il confronto per la parcellizzazione a 7 network, mentre le figure 7.8-7.10 per la parcellizzazione a 17 network. Ciascun boxplot è stato ricavato utilizzando le reti ottenute per i nove soggetti. L'analisi locale sulle differenze indotte dalla tipologia di stimolazione sono state svolte unicamente sulla parcellizzazione a 17 network poichè una maggiore risoluzione spaziale ha permesso di osservare meglio i risultati. Le figure 7.11 - 7.12 mostrano il confronto diretto tra le due diverse tipologie di stimolazione per l'analisi svolta nel ritmo theta. Ogni regione è colorata con una scala-colore dal blu al rosso, passando per il bianco: le regioni rosse intense rappresentano una variazione marcata di forza delle connessione tra le due condizioni, al contrario di quelle blu, le quali riportano l'effetto di una variazione negativa. La stessa tipologia di analisi è stata effettuata anche nel ritmo alfa (figure 7.13 - 7.14) e beta (figure 7.15 - 7.16). Con variazione di forza di connessione, si intende che tra le due condizioni di stimolazione si è osservata una variazione di

stabilità di differenza di fase tra due network qualsiasi nel corso dei cento stimoli.

Per concludere, è stata effettuata un'analisi riguardo al sito di stimolazione, la corteccia motoria M1 sull'emisfero sinistro, che corrisponde alla regione somatomotoria. In particolare è stato valutata l'eventuale presenza di una differenza significativa di stabilità di connessione. I boxplot nella figura 7.17 riporta i risultati.

7.1. Risultati

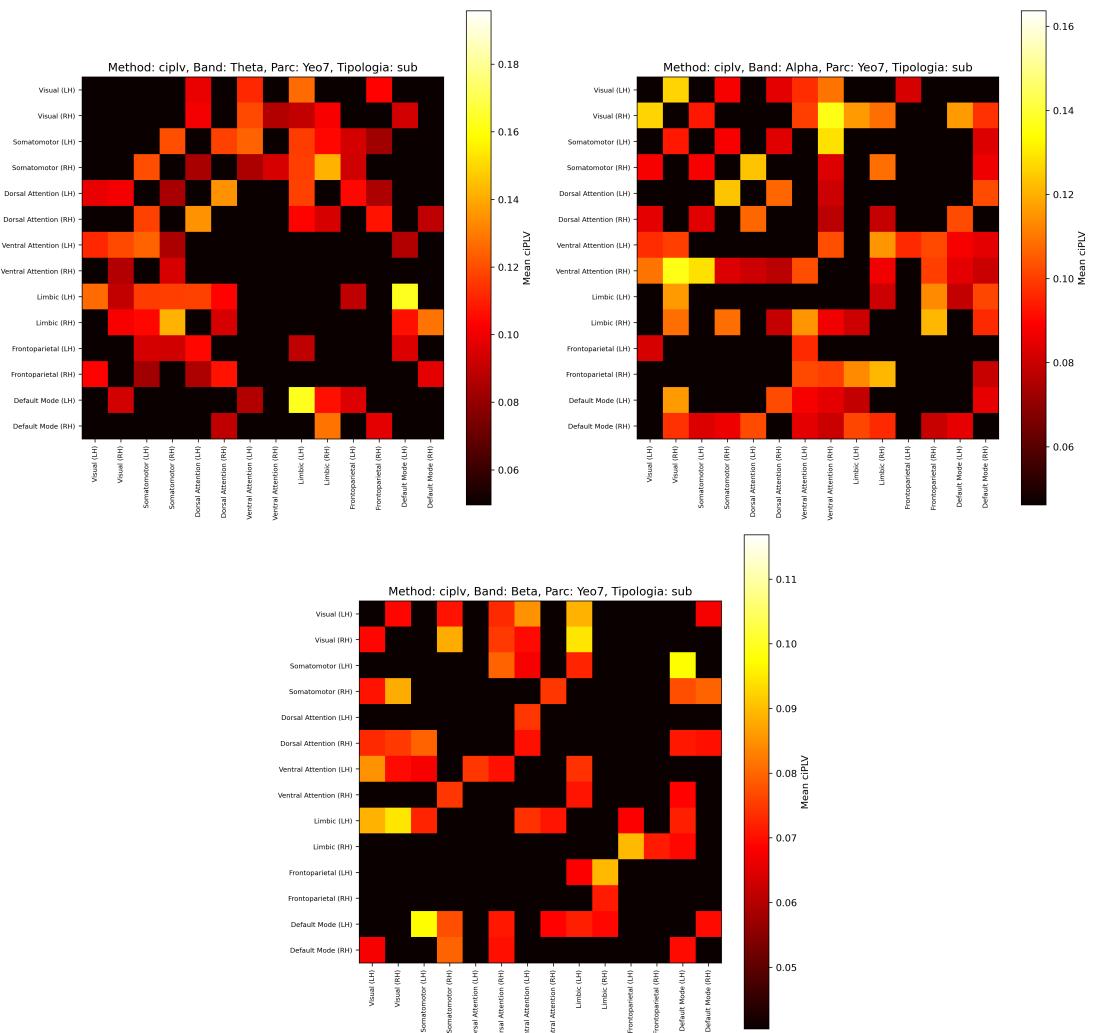


Figura 7.1: Matrici di adiacenza per stimolazione sotto-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 7 Network.

Capitolo 7. Risultati & Discussione

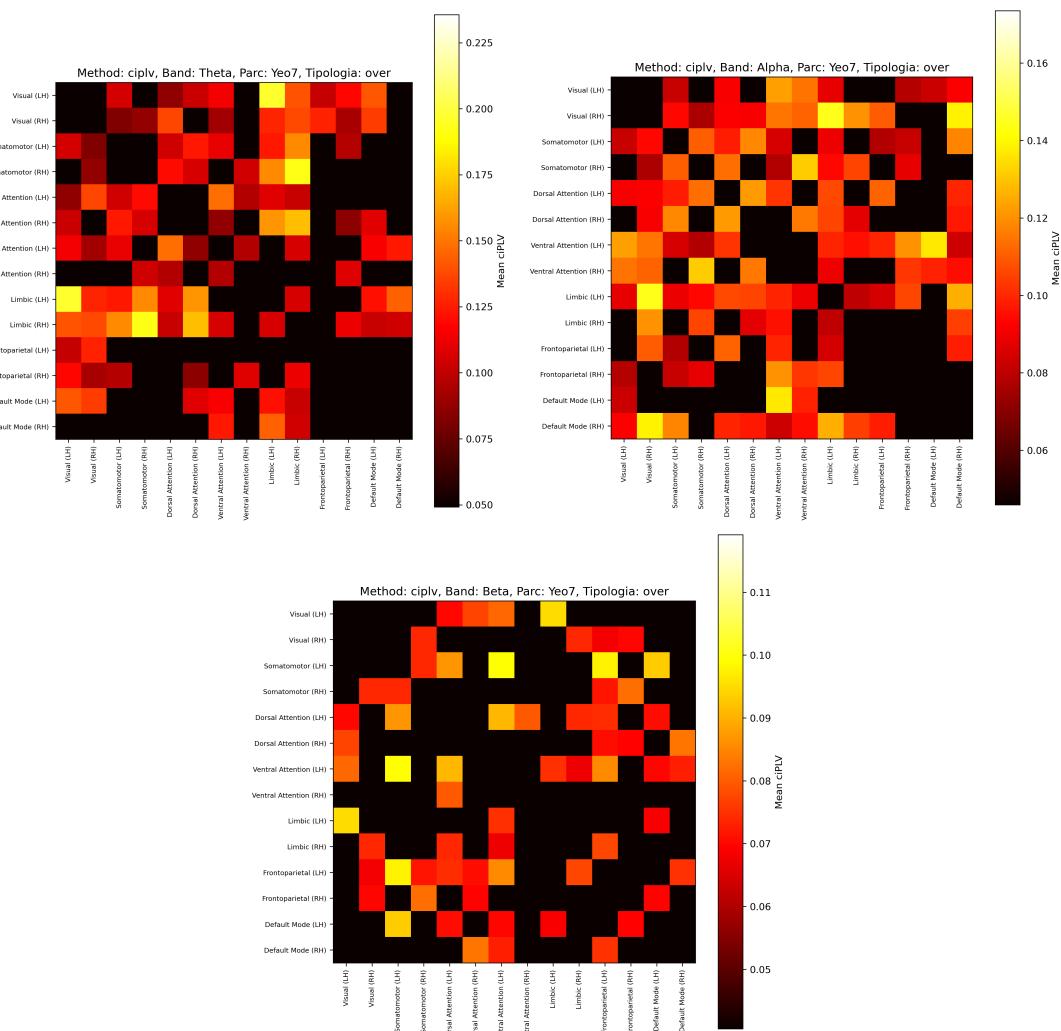


Figura 7.2: Matrici di adiacenza per stimolazione sopra-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 7 Network.

7.1. Risultati

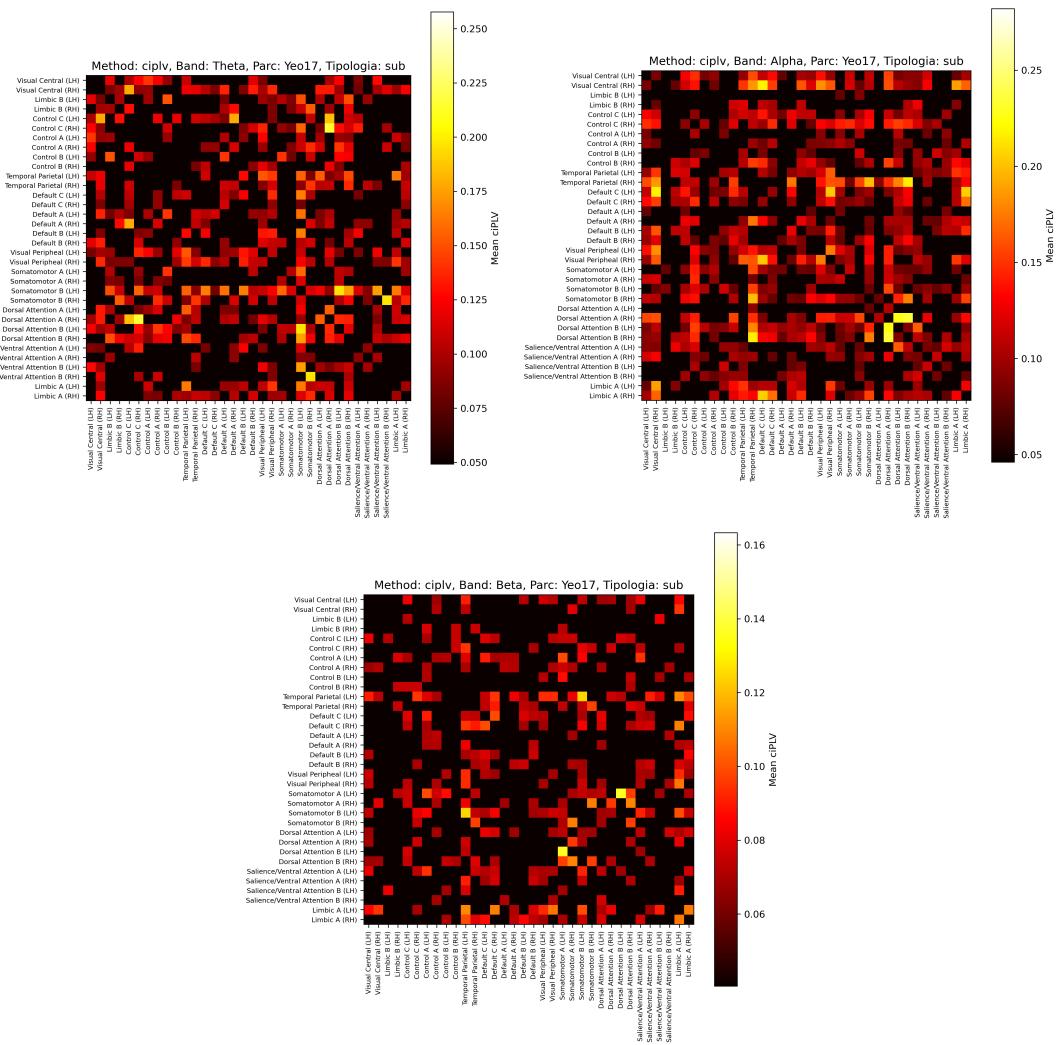


Figura 7.3: Matrici di adiacenza per stimolazione sotto-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 17 Network.

Capitolo 7. Risultati & Discussione

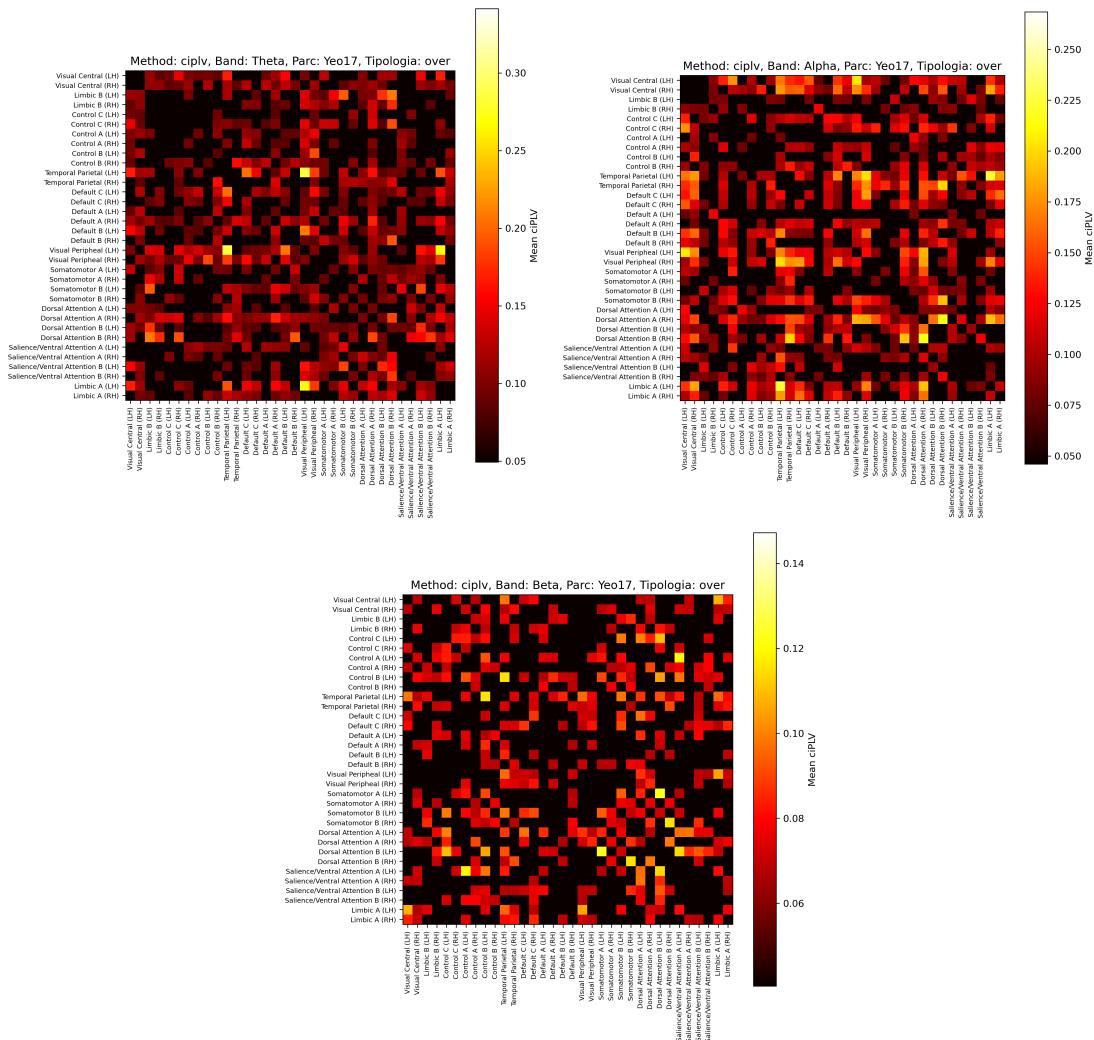


Figura 7.4: Matrici di adiacenza per stimolazione sopra-soglia nelle tre bande (in ordine theta, alfa e beta). Parcellizzazione Yeo a 17 Network.

7.1. Risultati

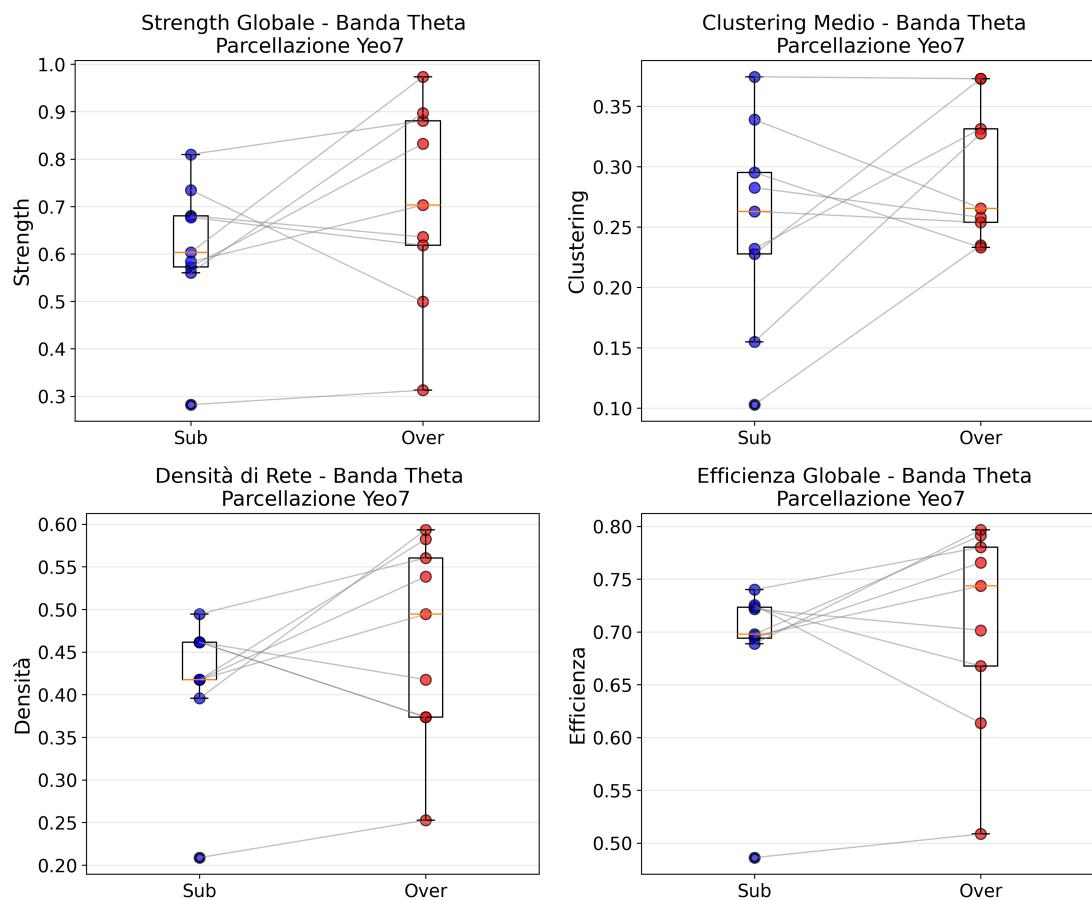


Figura 7.5: BoxPlot delle quattro metriche in banda theta - Parcellazione Yeo 7 Network

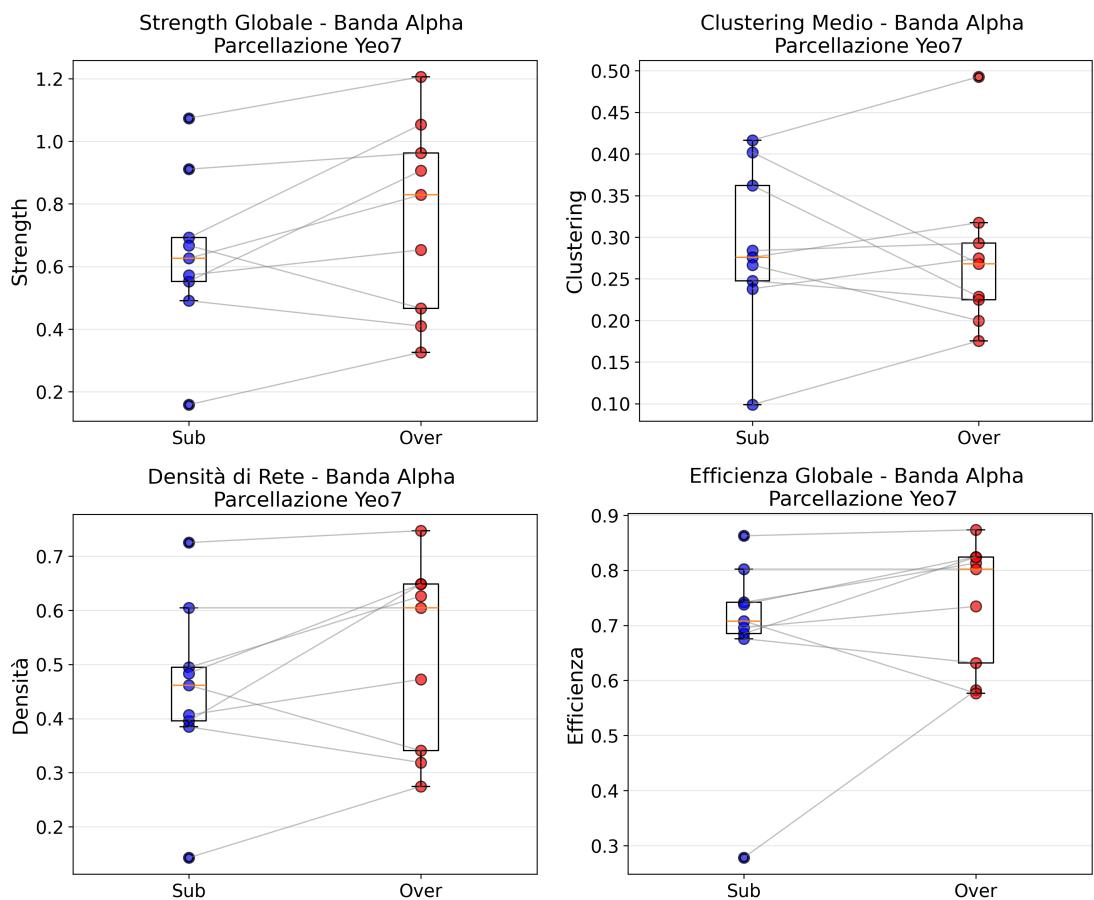


Figura 7.6: BoxPlot delle quattro metriche in banda alpha - Parcellazione Yeo 7 Network

7.1. Risultati

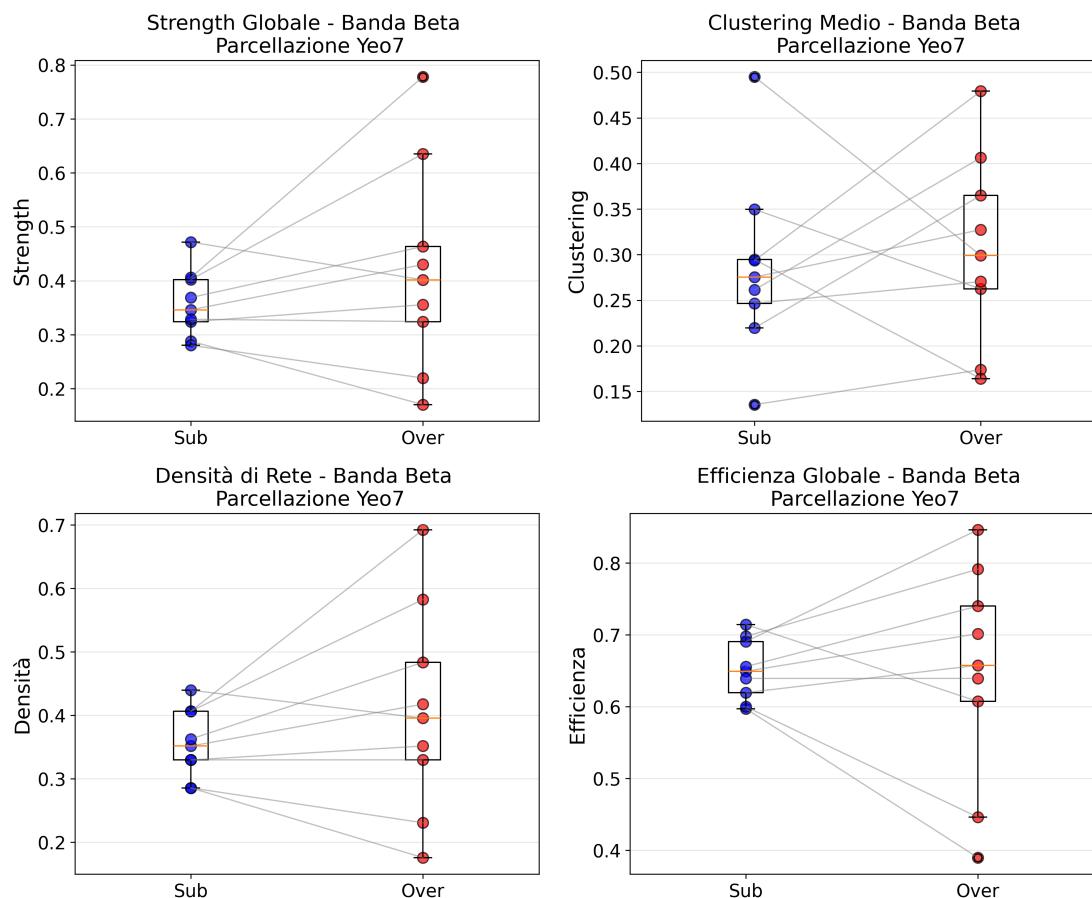


Figura 7.7: BoxPlot delle quattro metriche in banda beta - Parcellazione Yeo 7 Network

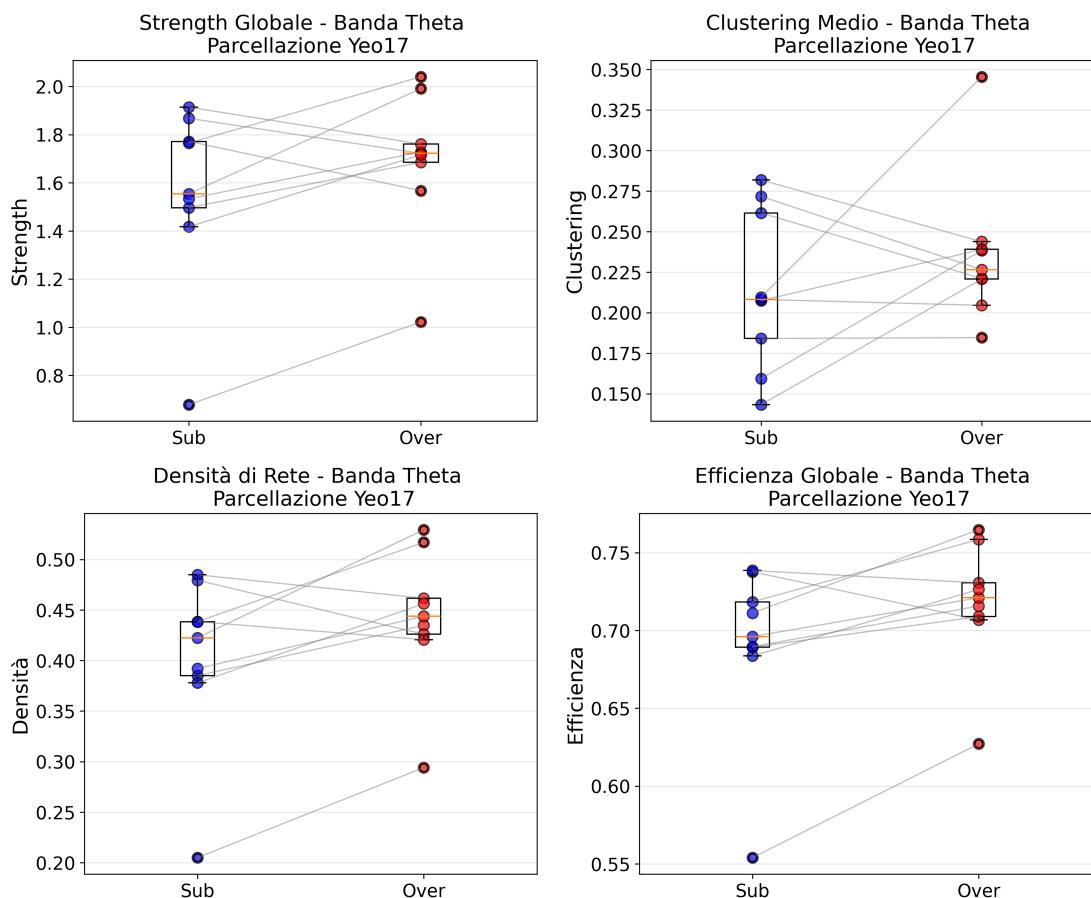


Figura 7.8: BoxPlot delle quattro metriche in banda theta - Parcellazione Yeo 17 Network

7.1. Risultati

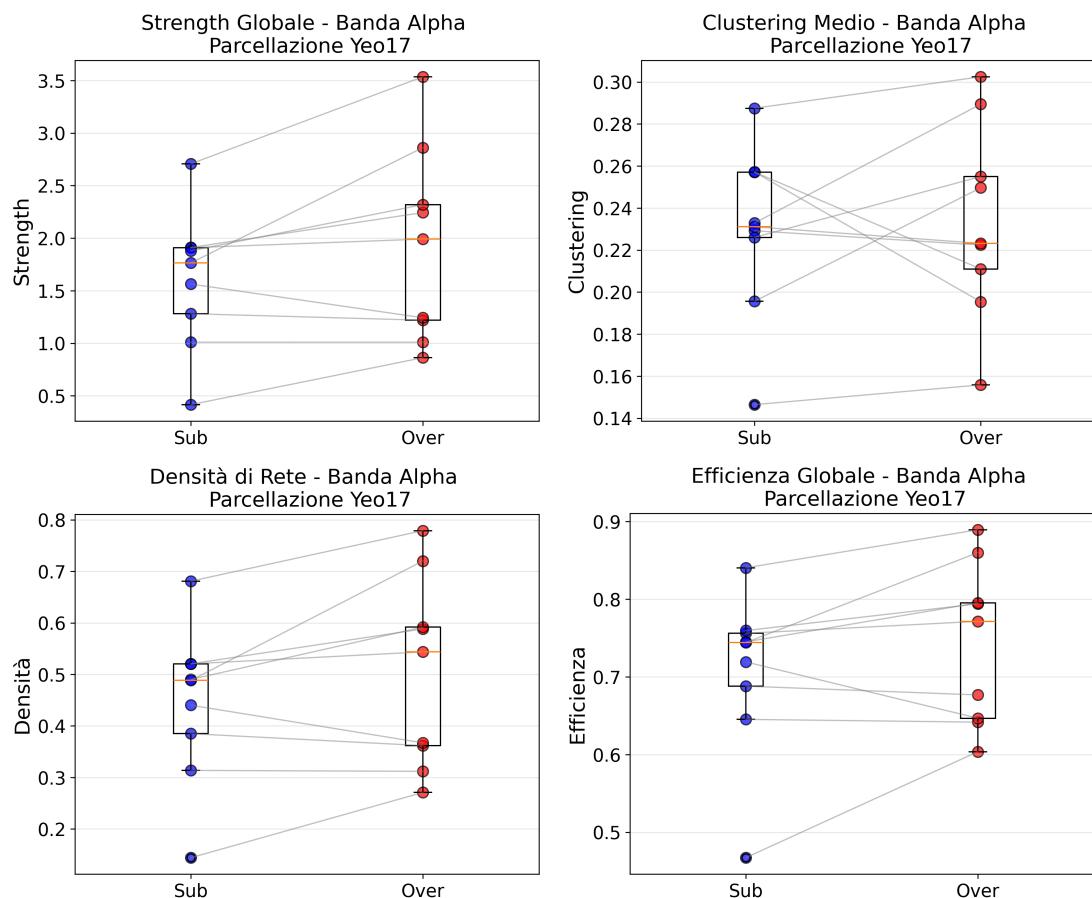


Figura 7.9: BoxPlot delle quattro metriche in banda alpha - Parcellazione Yeo 17 Network

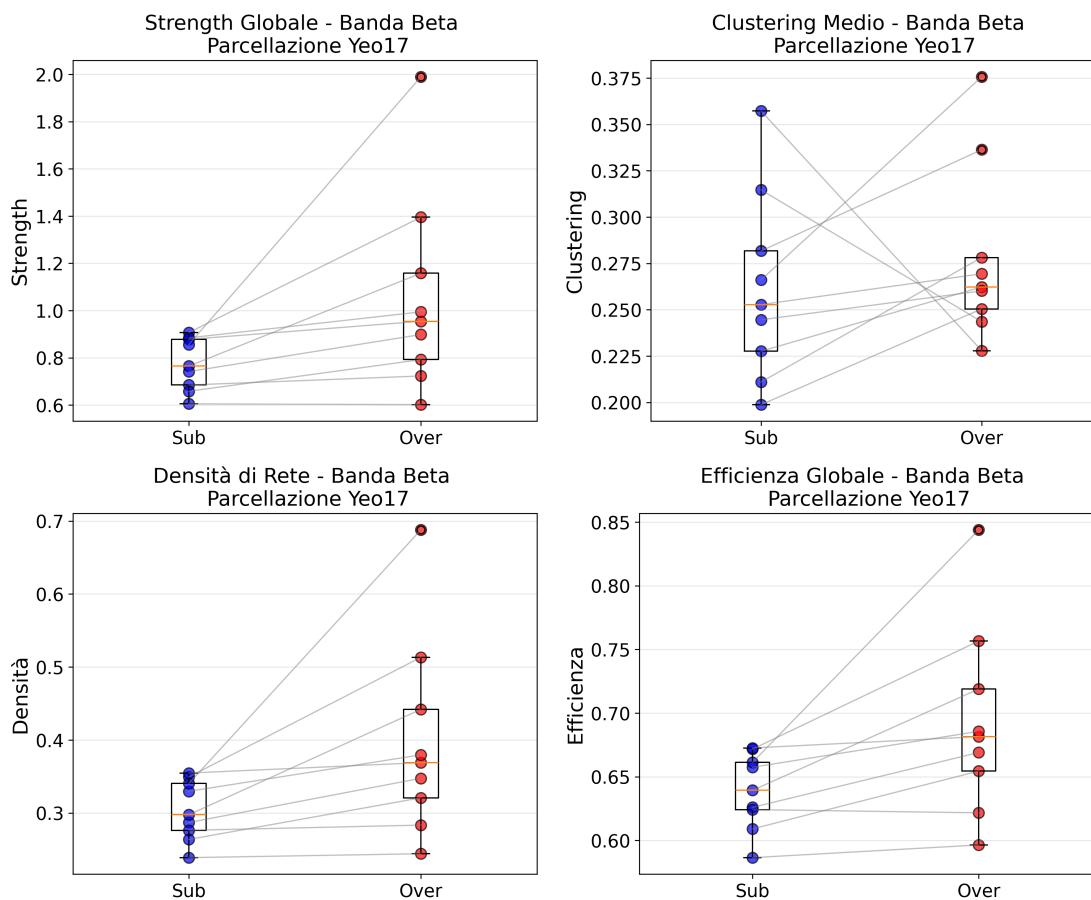


Figura 7.10: BoxPlot delle quattro metriche in banda beta - Parcellazione Yeo 17 Network

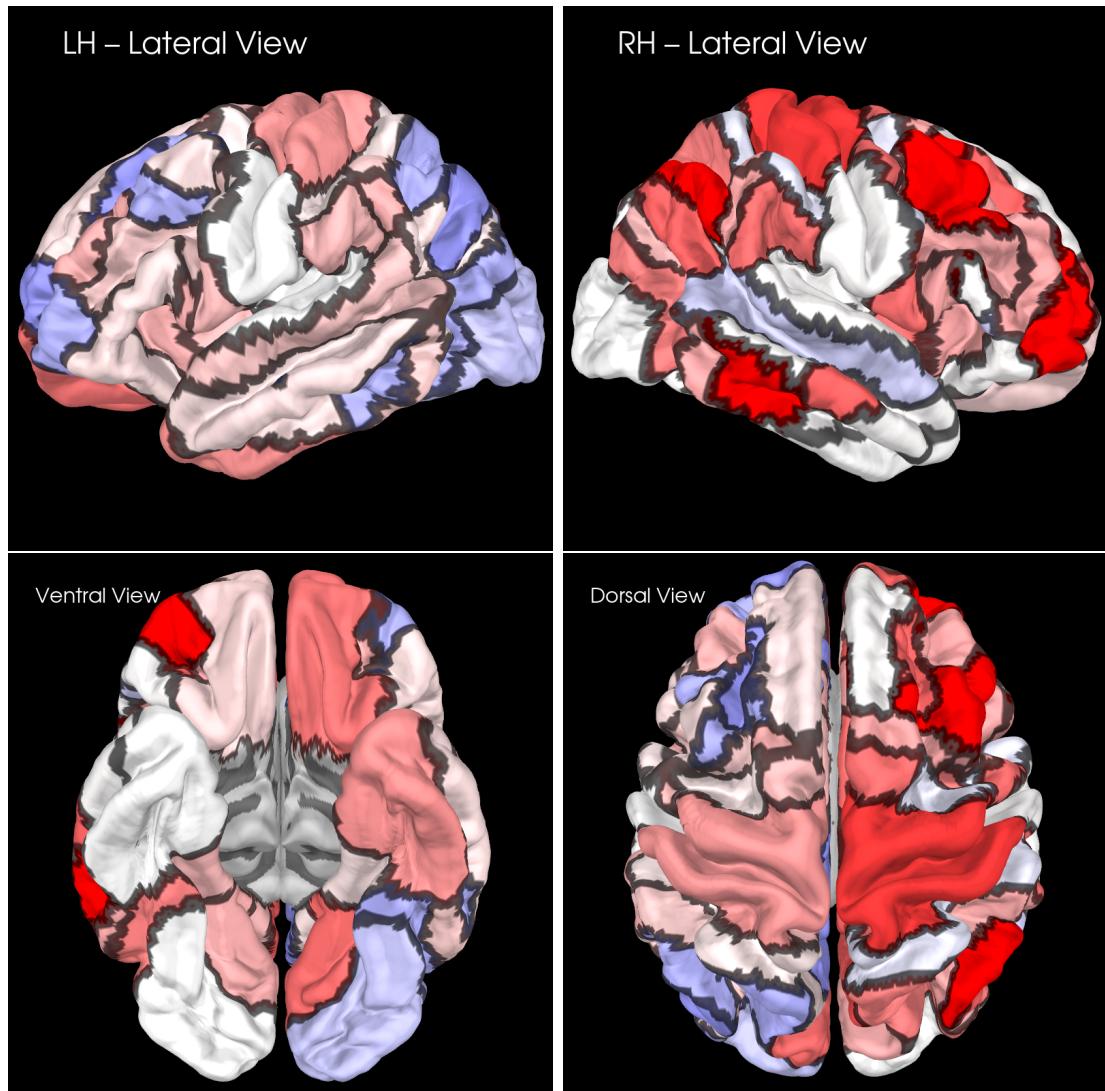


Figura 7.11: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda theta

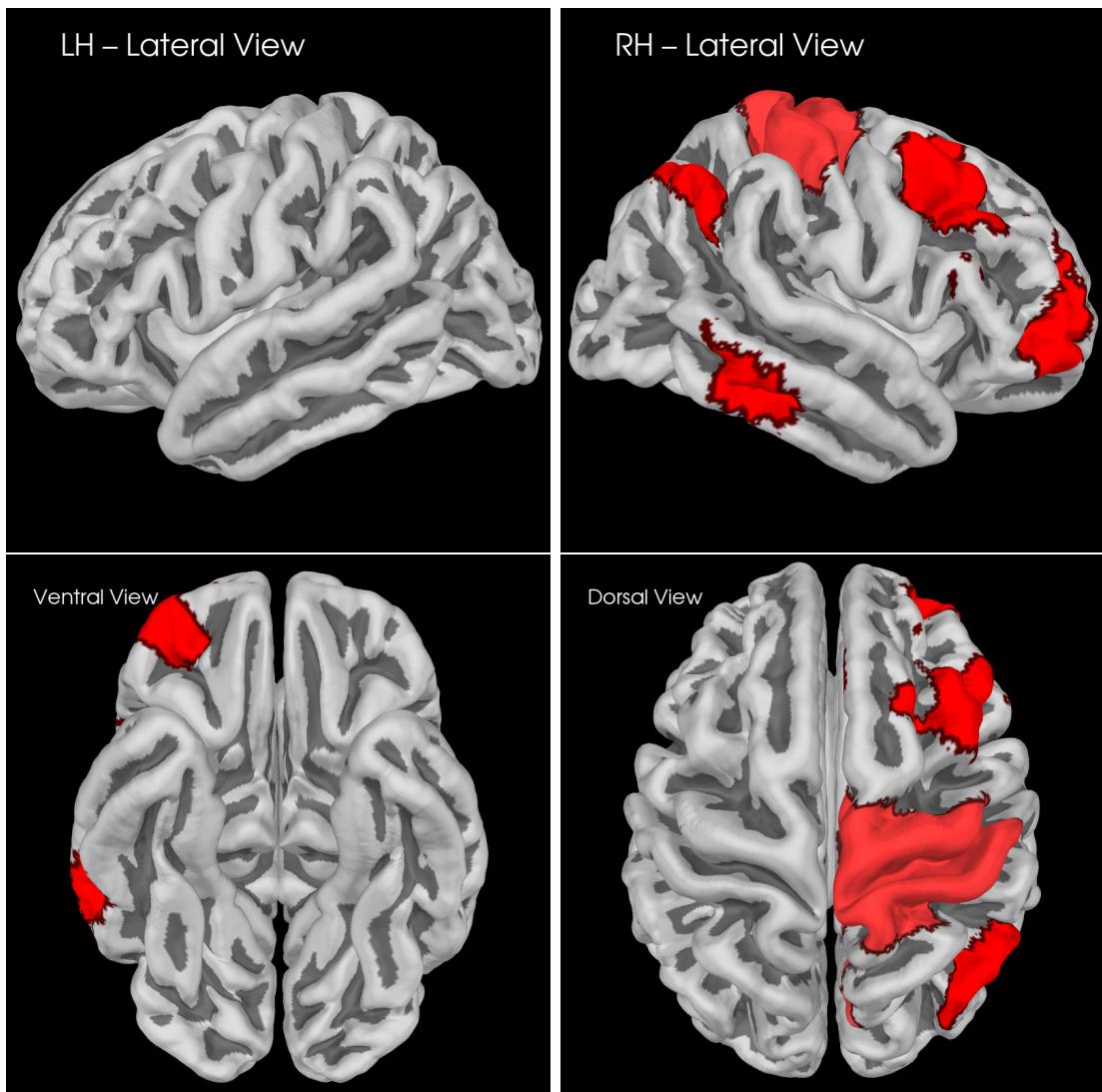


Figura 7.12: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione significative di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda theta

7.1. Risultati

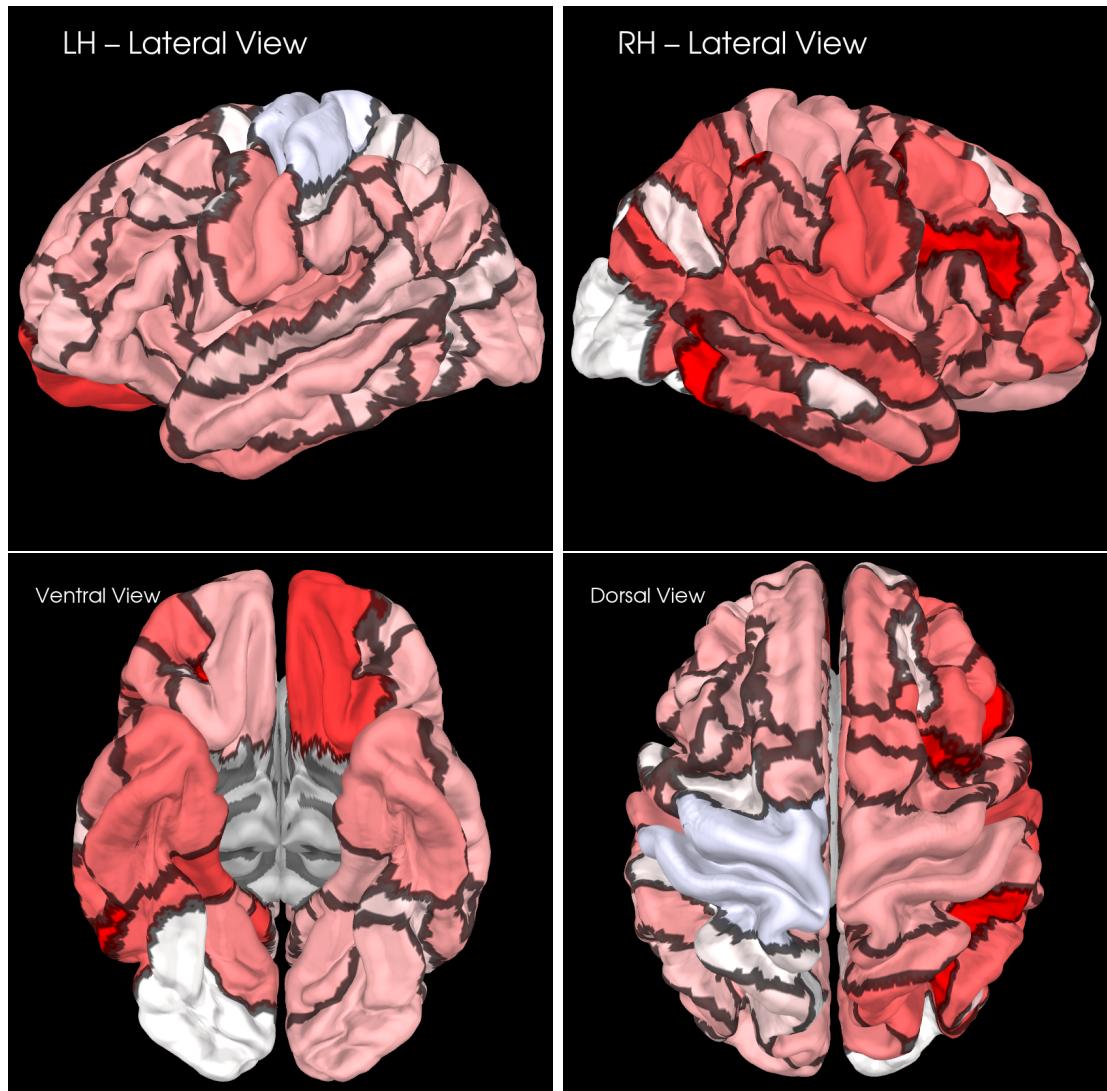


Figura 7.13: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda alpha

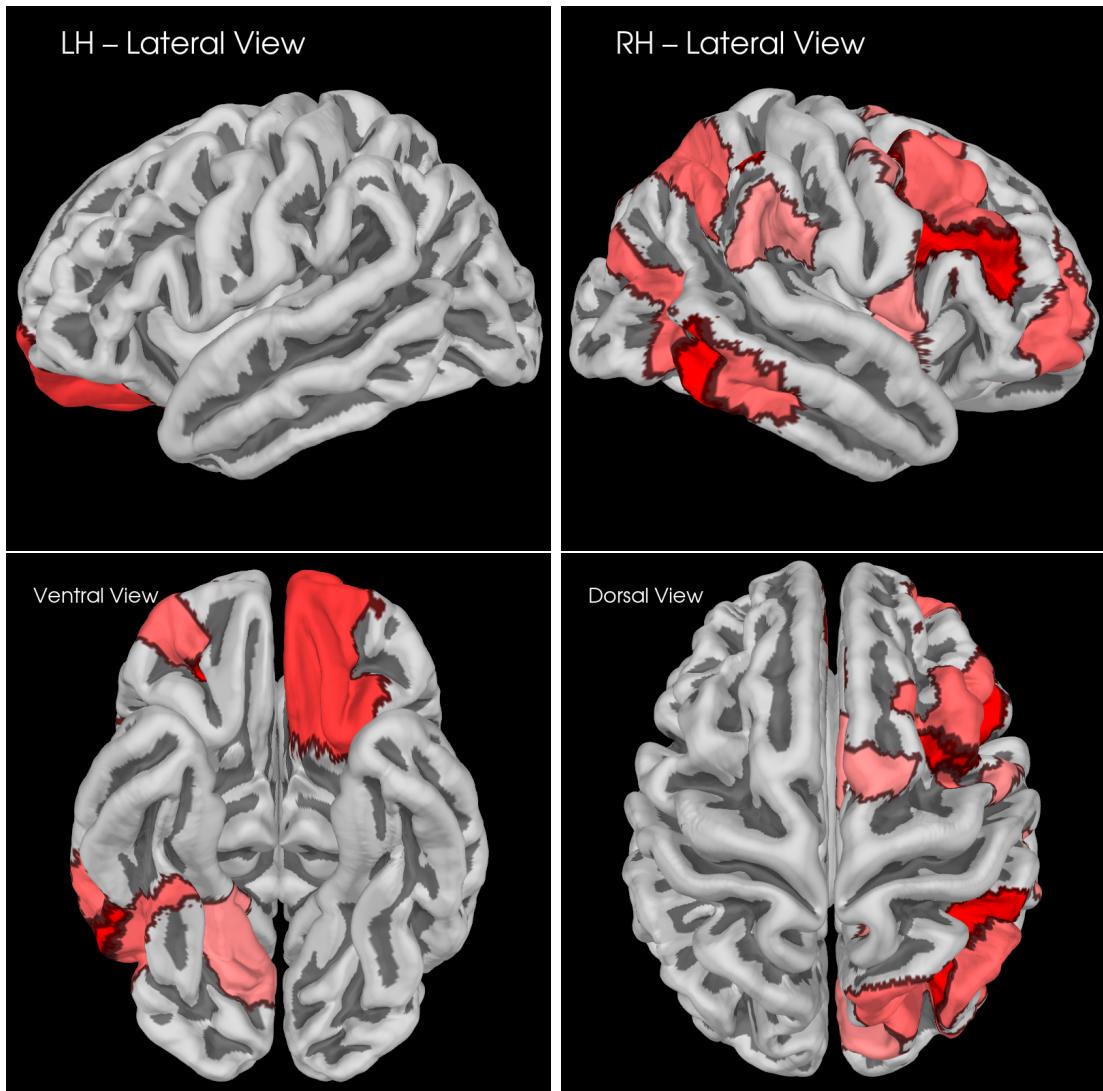


Figura 7.14: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione significativa di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda alpha

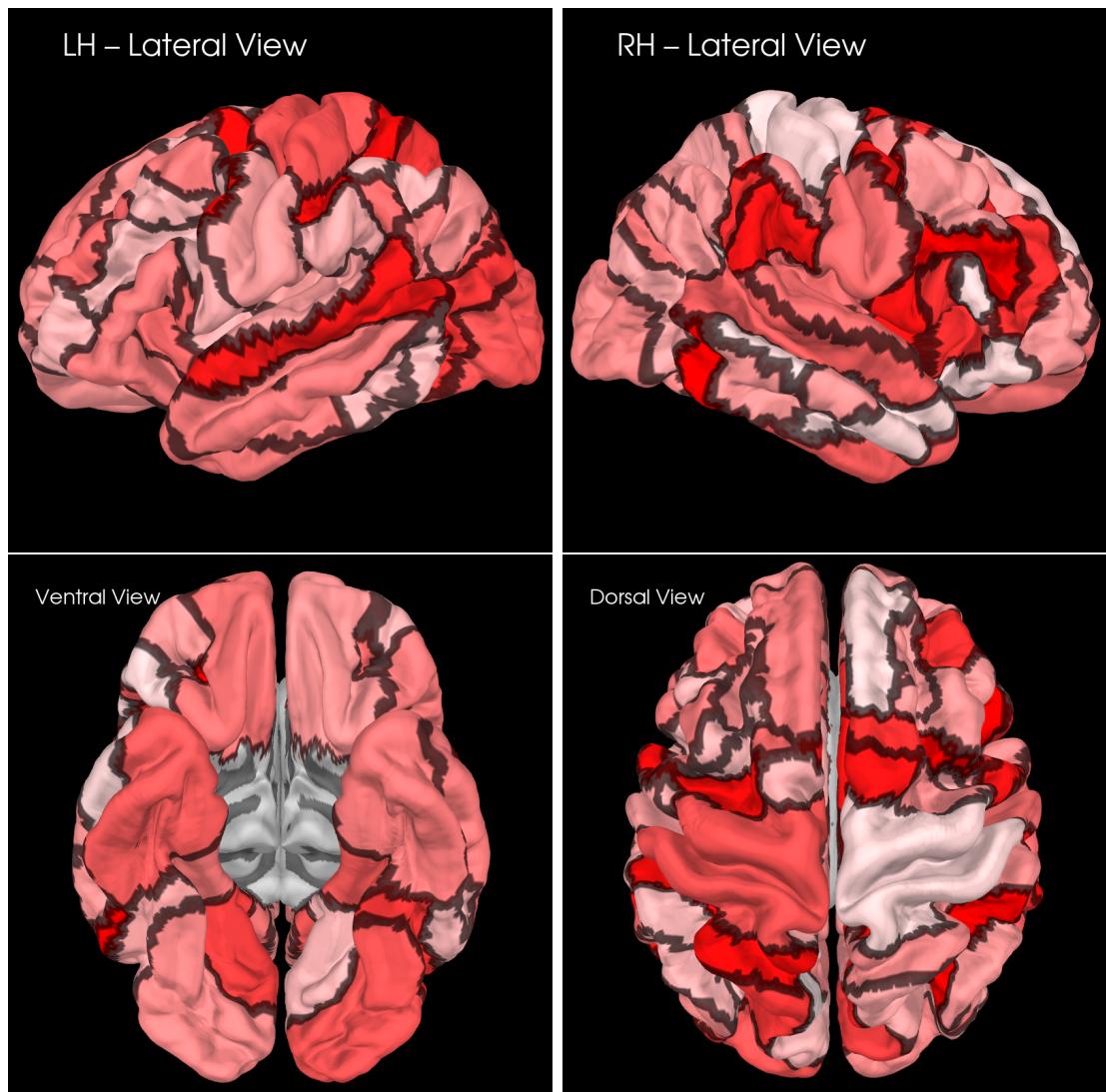


Figura 7.15: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda beta

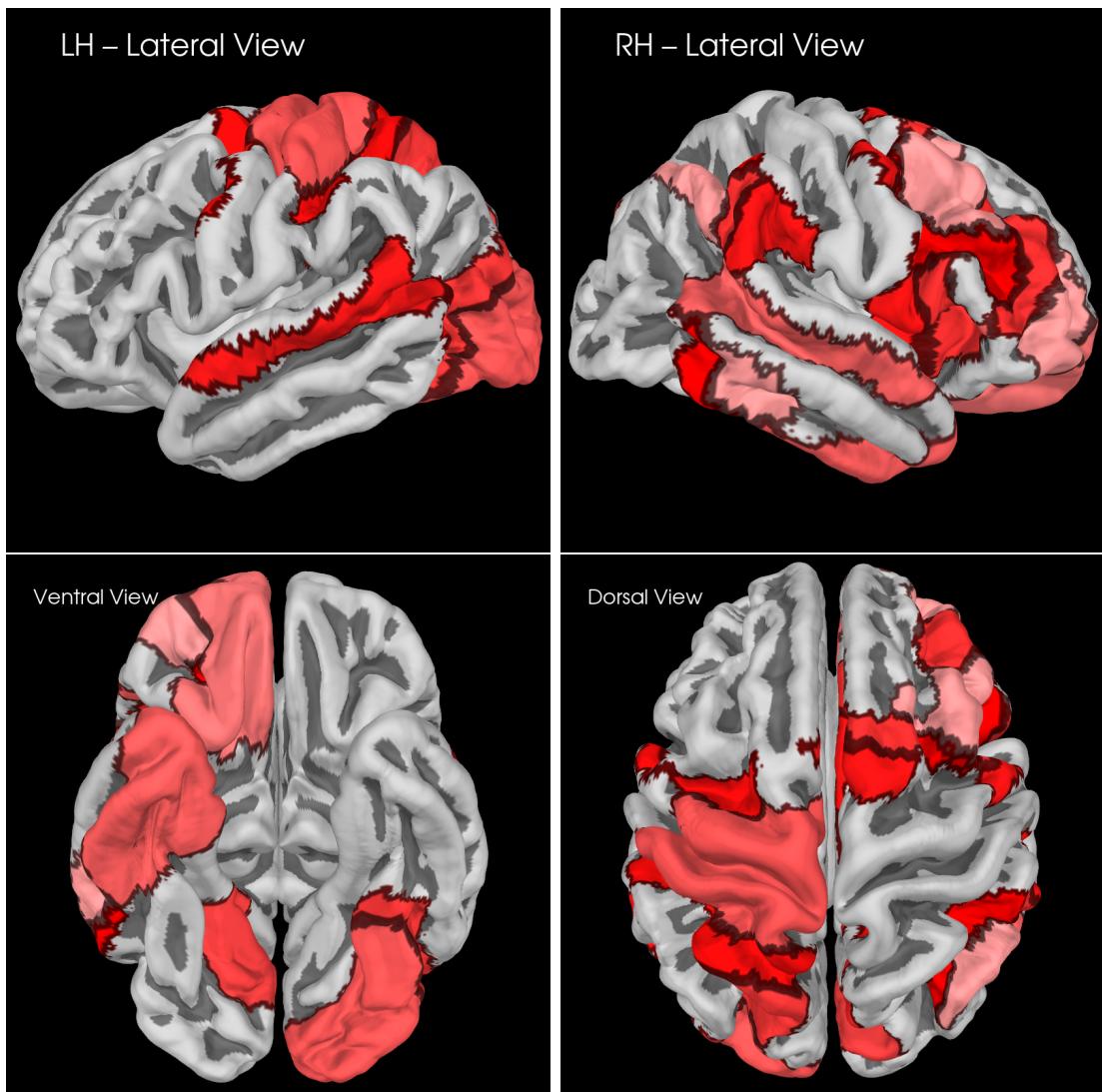


Figura 7.16: Raffigurazione tridimensionale su *fsaverage* della variazione della forza di connessione significativa di ciascuna ROI confrontando stimolazione sopra-soglia e sotto-soglia in banda beta

7.1. Risultati

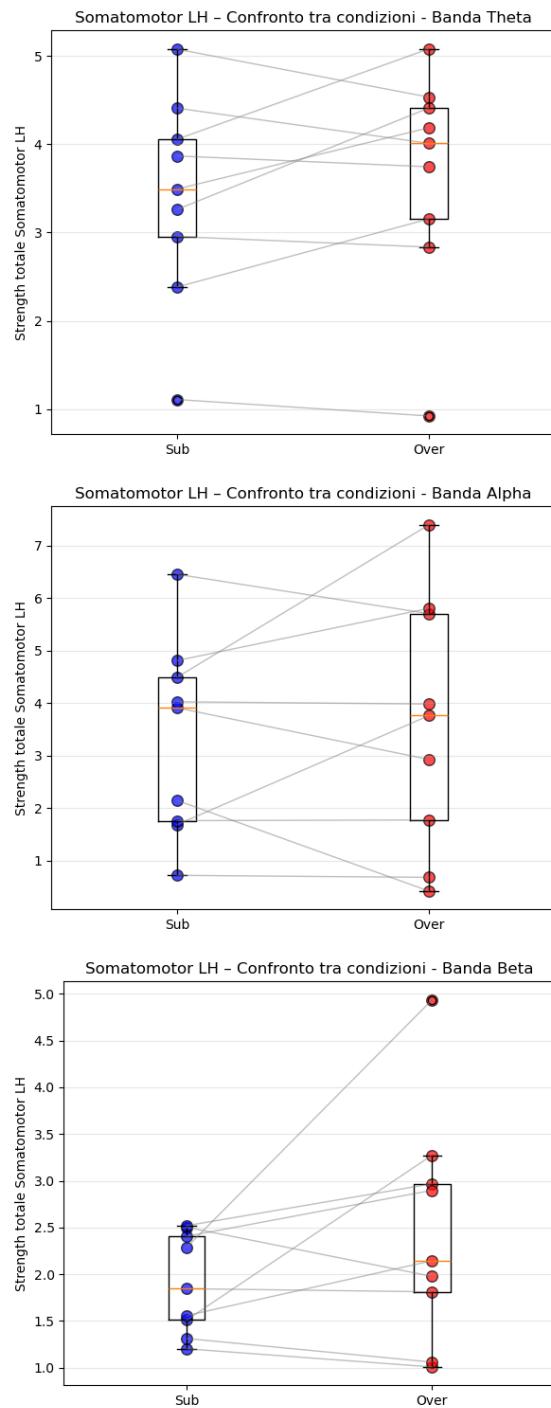


Figura 7.17: Valutazione della forza di connessione in base alle differenti tipologie di evento nel sito di stimolazione

7.2 Discussione

Un'analisi preliminare delle matrici di adiacenza ottenute tramite la parcellizzazione a 7 network con stimolazione sotto-soglia, riportate in figura 7.1, mostra una distribuzione delle connessioni più estesa nei ritmi theta e alfa rispetto al beta, che invece presenta numerose connessioni non superanti il passaggio di sogliatura. La stessa situazione si osserva anche nelle matrici relative alla stimolazione sopra-soglia, in figura 7.2. L'unica differenza evidente è un aumento della densità delle connessioni reali in ciascun ritmo. Tuttavia, a livello di pattern non emerge una somiglianza tra le due tipologie di stimolazione. Ciò potrebbe indicare che intensità diverse abbiano modificato i circuiti di attivazione, sincronizzando o inibendo aree differenti. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere legata a un movimento della testa del soggetto durante l'acquisizione. Nonostante l'uso dei tappi per le orecchie, la stimolazione produce un suono che può indurre brevi reazioni automatiche, in particolare nella condizione sopra-soglia. Le stesse caratteristiche si riscontrano anche nella parcellizzazione a 17 network, nelle figure 7.3 e 7.4: il ritmo beta risulta costantemente rappresentato da una matrice meno densa, con un incremento visibile nella condizione sopra-soglia.

L'analisi riguardo le metriche dei grafi è stata condotta applicando il test statistico non - parametrico di Wilcoxon, poichè altri test non sono applicabili dato il numero ridotto di soggetti a disposizione che impedisce di verificare la normalità della distribuzione. Altri studi in ambito EEG hanno optato per la stessa tipologia di test [21]. Dal punto di vista delle metriche globali delle reti, i boxplot contenuti nelle figure 7.5 e 7.7 mostrano come tendenzialmente la stimolazione sopra-soglia garantisca una maggiore forza media delle connessioni, una maggiore densità della rete e di conseguenza anche una maggiore efficienza globale rispetto alla stimolazione sotto-soglia, mentre il coefficiente medio di clustering, non sembra prevalere in una situazione specifica. Il test statistico effettuato sulle reti in ritmo theta mostra come mediamente la stimolazione sopra-soglia sia superiore in tutte le metriche, tuttavia in nessuna di esse questo effetto risulta essere statisticamente significativo, infatti tutti i p-value sono superiori a 0.05, senza un andamento netto indicato dal coefficiente d di Cohen. Per quanto riguarda la banda alfa, l'unica differenza consiste nell'inversione di tendenza del coefficiente di clustering: la media è maggiore nella stimolazione sotto-soglia. Nonostante ciò, anche in questa situazione nessuna variazione può essere considerata statisticamente significativa, ma i p-value si avvicinano al valore soglia

7.2. Discussione

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.69 \pm 0.07	0.71 \pm 0.09	0.2129	0.301
Clustering	0.25 \pm 0.08	0.29 \pm 0.05	0.4258	0.442
Densità	0.42 \pm 0.08	0.47 \pm 0.11	0.1504	0.477
Strength	0.61 \pm 0.14	0.71 \pm 0.20	0.1016	0.472

Tabella 7.1: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda theta - Parcellizzazione: 7 Network.

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.69 \pm 0.16	0.74 \pm 0.11	0.1038	0.431
Clustering	0.29 \pm 0.09	0.27 \pm 0.09	0.9102	-0.158
Densità	0.46 \pm 0.15	0.52 \pm 0.16	0.0617	0.547
Strength	0.64 \pm 0.24	0.76 \pm 0.29	0.0645	0.644

Tabella 7.2: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda alpha - Parcellizzazione: 7 Network.

di 0.05.

Discorso diverso invece per quanto riguarda il ritmo beta, le metriche che negli

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.65 \pm 0.04	0.65 \pm 0.14	0.5000	-0.040
Clustering	0.29 \pm 0.09	0.31 \pm 0.10	0.6523	0.147
Densità	0.36 \pm 0.05	0.41 \pm 0.15	0.1313	0.410
Strength	0.36 \pm 0.06	0.42 \pm 0.18	0.2129	0.399

Tabella 7.3: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda beta - Parcellizzazione: 7 Network.

altri ritmi hanno mostrato un aumento netto, ora sembrano tornare più stabili nonostante siano superiori nella stimolazione sopra-soglia. Per questo motivo, anche in quest'ultima banda, nessuna differenza è statisticamente significativa.

Le stesse metriche sono state successivamente valutate anche per la parcellazione a 17 network. I boxplot riportati nelle figure 7.8-7.10 mostrano un comportamento

simile alla precedente suddivisione corticale: strength, densità ed efficienza globale aumentano con l'intensità della stimolazione, mentre il coefficiente di clustering sembra non mostrare una differenza significativa. Lo stesso test statistico è stato effettuato anche per questa situazione (tabelle 7.4 -7.6).

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.69 \pm 0.05	0.72 \pm 0.04	0.0273	0.854
Clustering	0.21 \pm 0.05	0.24 \pm 0.04	0.5703	0.344
Densità	0.40 \pm 0.08	0.44 \pm 0.06	0.0488	0.700
Strength	1.56 \pm 0.35	1.69 \pm 0.28	0.0488	0.569

Tabella 7.4: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda theta - Parcellizzazione: 17 Network.

Le tabelle precedenti confermano quanto osservato nei boxplot. Per ciascun ritmo

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.71 \pm 0.10	0.74 \pm 0.10	0.0820	0.545
Clustering	0.23 \pm 0.04	0.23 \pm 0.04	0.6523	0.113
Densità	0.44 \pm 0.14	0.50 \pm 0.17	0.0488	0.669
Strength	1.60 \pm 0.61	1.92 \pm 0.86	0.0273	0.705

Tabella 7.5: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda alpha - Parcellizzazione: 17 Network.

emerge un aumento delle tre metriche all'aumentare dell'intensità della stimolazione; tuttavia, l'aspetto più rilevante riguarda i risultati di significatività. Nel ritmo theta (tabella 7.4) l'efficienza, la densità e la forza media risultano significativamente maggiori nella condizione sopra-soglia, con un effetto elevato, poiché tutti i coefficienti d superano il valore di 0.6. È comunque opportuno notare che densità e forza si collocano al limite della significatività. Un comportamento simile, seppur meno marcato, si osserva nel ritmo alpha (tabella 7.5), dove l'efficienza non risulta significativa in quanto associata a un p-value superiore a 0.5. Nonostante ciò, si rileva un miglioramento rispetto alla parcellizzazione a 7 network. Il ritmo beta (tabella

Metrica	SUB (media \pm SD)	OVER (media \pm SD)	p-value	d
Efficienza	0.64 \pm 0.03	0.69 \pm 0.07	0.0039	0.933
Clustering	0.26 \pm 0.05	0.28 \pm 0.04	0.4961	0.226
Densità	0.30 \pm 0.04	0.40 \pm 0.13	0.0020	0.854
Strength	0.78 \pm 0.10	1.06 \pm 0.40	0.0039	0.783

Tabella 7.6: Confronto tra le metriche di rete per le condizioni sotto-soglia (SUB) e sopra-soglia (OVER) in banda beta - Parcellizzazione: 17 Network.

7.6) mostra invece l'incremento più evidente: tutte e tre le metriche aumentano con una stimolazione più intensa e presentano livelli di significatività elevati, con p-value nettamente inferiori a 0.05. Il coefficiente di clustering, al contrario, non raggiunge la significatività in nessuna banda. Nella parcellizzazione a 7 network le tre metriche avevano mostrato un trend coerente ma senza superare la soglia di significatività, nonostante si fossero avvicinate. Con una risoluzione corticale maggiore, invece, le metriche superano quasi sempre la soglia in tutte le bande. Ciò potrebbe indicare che la valutazione delle connessioni richieda una risoluzione più fine: ROI troppo ampie, infatti, mediane un numero elevato di serie temporali, riducendo alcune caratteristiche dinamiche del segnale. Inoltre, potrebbe capitare che alcune metriche non raggiungano la soglia di significatività perché il numero di campioni è troppo ridotto. Dal punto di vista fisiologico, questi risultati suggeriscono che un incremento dell'intensità della stimolazione comporti un coinvolgimento maggiore delle sorgenti neurali, come indicato dall'aumento significativo della densità, intesa come numero di connessioni che superano la soglia definita dai surrogati. Anche la forza media delle connessioni risulta superiore, indicando che la sincronizzazione tra i nodi potrebbe mantenersi più a lungo nel caso della stimolazione sopra-soglia. Ciò è particolarmente rilevante considerando che la finestra analizzata è relativamente tardiva rispetto agli effetti rapidi della TMS. Queste proprietà di rete si riflettono anche sull'efficienza globale, che risulta maggiore con intensità di stimolazione più elevate: una densità e una forza più alte rendono infatti la rete più efficiente nello scambio informativo, facilitando la comunicazione anche tra regioni distanti. Per quanto riguarda il clustering, non emergono differenze nelle diverse bande e parcellazioni, poiché entrambe le stimolazioni tendono ridurre la segregazione della rete per favorire l'integrazione. L'analisi effettuata a livello locale ha permesso di visualizzare con una lente di

ingrandimento come varia la forza delle connessioni, prese singolarmente per nodo. Iniziando dalla banda theta, rappresentata dalla figura tridimensionale 7.11, si nota una prevalenza di nodi aventi un incremento medio della forza di connessione, la maggior parte localizzati nell'emisfero destro. Tuttavia, in questa banda è prevalente anche una modesta presenza di regioni corticali che mostrano un decremento della stabilità di connessione dopo aver aumentato l'intensità della stimolazione, la maggior parte localizzate nell'emisfero sinistro. Questo potrebbe significare che l'erogazione dello stimolo, partita appunto nella zona M1 a sinistra, incida inizialmente sulla forza di connessione dei network in prossimità del sito di stimolazione, ma in una finestra tardiva come quella analizzata, abbia gli effetti maggiori nell'emisfero opposto. Come si può notare nella figura 7.12, è vero che l'incremento medio sia diffuso ma, i nodi, presi singolarmente mostrano un aumento significativo della forza di connessione solamente in tre aree, come si può vedere nella tabella 7.7 Tutte localizzate nell'emi-

Network	SUB	OVER	Δ	p-value
<i>control C (RH)</i>	1.1527	1.5833	0.4305	0.0098
<i>control B (RH)</i>	0.9924	1.6376	0.6452	0.0371
<i>somatotomotor A (RH)</i>	1.1430	1.6374	0.4945	0.0371

Tabella 7.7: Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda theta

sfero destro.

Nella figura 7.13 si nota un comportamento leggermente diverso per quanto riguarda la connettività in banda alfa. In particolare si osserva che complessivamente la corteccia ha subito un incremento medio della forza di connessione, poichè non esistono aree colorate di blu, a differenza del ritmo theta. Il comportamento simile però si ha nel lato in cui si verificano le connessioni incrementate maggiormente, infatti l'emisfero destro mostra un colore rosso più intenso più o meno ovunque, a differenza del lato sinistro. Tuttavia, la figura 7.14 rappresenta il numero delle regioni con incremento significativo nella forza delle connessioni. I network sono riportati nella tabella 7.8. Come si può notare, anche in questo caso, la maggior parte sono localizzate nell'emisfero destro. .

Per concludere, la figura 7.15 mostra la distribuzione corticale dell'incremento della forza di sincronizzazione. Come già osservato per il ritmo alpha, non sono presenti regioni con un decremento. A differenza dei casi precedenti, tuttavia, l'intensità di

7.2. Discussione

Network	SUB	OVER	Δ	p-value
<i>Dorsal Attention A (RH)</i>	2.0423	2.5379	0.4955	0.0059
<i>Control A (RH)</i>	1.1744	1.9946	0.8201	0.0059
<i>Visual Peripheal (RH)</i>	1.6381	2.0122	0.3741	0.0137
<i>Control B (RH)</i>	1.2660	1.7624	0.4965	0.0137
<i>Limbic B (LH)</i>	1.3833	2.0189	0.6356	0.0195
<i>Salience/Ventral Attention A (RH)</i>	1.5935	1.9612	0.3677	0.0273

Tabella 7.8: Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda alpha

tali incrementi risulta più uniformemente distribuita tra i due emisferi. Le regioni che mostrano una variazione statisticamente significativa sono aumentate, con una prevalenza nell'emisfero destro, come riportato nella figura 7.16. La tabella 7.9 mostra i network che hanno mostrano un incremento significativo in banda beta, si osserva che la maggioranza continua ad essere localizzata nell'emisfero destro. Per concludere,

Network	SUB	OVER	Δ	p-value
<i>Salience/Ventral Attention B (RH)</i>	0.5161	0.9414	0.4253	0.0059
<i>Control A (RH)</i>	0.7169	1.2403	0.5234	0.0039
<i>Visual Central (LH)</i>	0.6927	1.0364	0.3436	0.0371
<i>Salience/Ventral Attention A (RH)</i>	0.7425	1.2245	0.4820	0.0273
<i>Dorsal Attention A (LH)</i>	0.7466	1.1517	0.4051	0.0273
<i>Visual Peripheal (RH)</i>	0.7017	1.0867	0.3850	0.0195
<i>Temporal Parietal (RH)</i>	1.0574	1.3788	0.3214	0.0273
<i>Temporal Parietal (LH)</i>	0.9232	1.3937	0.4705	0.0273
<i>Control B (RH)</i>	0.4370	0.6481	0.2111	0.0273
<i>Limbic A (RH)</i>	0.8784	1.2081	0.3297	0.0371
<i>Control C (RH)</i>	0.5461	0.9898	0.4437	0.0371
<i>Limbic B (RH)</i>	0.6330	0.9127	0.2797	0.0371
<i>Dorsal Attention B (LH)</i>	0.8812	1.3770	0.4958	0.0488
<i>Somatomotor A (LH)</i>	0.9347	1.2853	0.3506	0.0488

Tabella 7.9: Valori di variazioni significative di strength nelle condizioni sotto-soglia e sopra-soglia in banda beta

la presenza di un aumento della stabilità di connessione, soprattutto nell'emisfero destro, opposto al sito scelto per la stimolazione, potrebbe essere spiegato in primo luogo dalla finestra di osservazione tardiva rispetto allo stimolo, in secondo luogo, invece potrebbe essere un problema indotto dalla stessa stimolazione. Infatti, come già spiegato, l'erogazione dello stimolo potrebbe aver provocato contrazioni muscolari che hanno modificato la sincronizzazione di fase delle regioni nelle vicinanze.

L'ultima analisi è stata effettuata visualizzando solamente il comportamento della strength del network *somatomotor (LH)*, cioè il sito in cui è stato erogato lo stimolo: la zona M1 sinistra, suddivisa in *somatomotor A (LH)* e *somatomotor B (LH)* nella parcellizzazione a 17 network. Le due zone sono state unite per valutare se una stimolazione sopra-soglia provocasse un incremento della forza di connessione. Tuttavia, come mostrano i boxplot nella figura 7.17, l'intensità della stimolazione non incide significativamente sulla forza di connessione del sito. Infatti, nei ritmi theta e beta la forza media di connessione di questo nodo risulta essere leggermente superiore, mentre in alfa è addirittura calata. Probabilmente le connessioni maggiori sono presenti nei primi istanti della stimolazione, mentre, in una fase successiva, questa zona si sta già dirigendo verso un ritorno all'equilibrio mentre altre regioni mostrano forze di connessioni superiori.

Capitolo 8

Conclusione

Nell'introduzione sono state poste alcune domande, sintetizzabili nella seguente: lo stimolo TMS induce variazioni nelle attivazioni dei network cerebrali? Per rispondere a questa domanda sono state effettuate valutazioni in relazione all'intensità della stimolazione, inizialmente sotto-soglia motoria e successivamente sopra-soglia. Ci si è quindi chiesti se un aumento dell'intensità, mantenendo invariato il sito di stimolazione, producesse effetti simili nei nove soggetti analizzati. Dunque l'attivazione di un network è stata valutata come una maggior stabilizzazione di differenza di fase nei confronti degli altri network. Uno dei risultati più rilevanti riguarda il fatto che incrementando l'intensità dello stimolo le metriche globali considerate hanno mostrato un aumento significativo, come ipotizzato. Ad esempio, la strength globale delle connessioni ha evidenziato un incremento in tutte le bande EEG analizzate, così come l'efficienza globale, che quantifica la capacità della rete di mettere in comunicazione anche regioni distanti. Questo indica che uno stimolo più intenso ha indotto una maggiore sincronizzazione globale tra le varie regioni e ha reso la rete più integrata. Non tutte le metriche, tuttavia, hanno mostrato la stessa sensibilità: il coefficiente di clustering medio, introdotto come misura della segregazione, non ha evidenziato variazioni significative in alcuna direzione. L'analisi locale ha poi permesso di individuare più chiaramente quali regioni abbiano subito una variazione significativa della forza di connessione. In questo caso, il risultato più evidente è che la maggior parte delle regioni coinvolte si concentra nell'emisfero destro, evidenziando come, in una finestra temporale tardiva rispetto allo stimolo, le sincronizzazioni più stabili si manifestino prevalentemente nell'emisfero opposto a quello della stimolazione.

Per concludere, è necessario individuare anche i limiti inevitabili di questo studio, che potrebbero aver influenzato i risultati. Dal punto di vista tecnico della procedura sperimentale, nonostante l'utilizzo di strumentazione altamente specializzata, la riproducibilità può essere compromessa da alcune scelte operative. Ad esempio, garantire che il soggetto rimanga immobile per tutta la durata dell'esperimento non è semplice, e un movimento della testa potrebbe modificare il sito effettivo di

stimolazione, attivando e sincronizzando network diversi in base allo spostamento. Dal punto di vista dell'elaborazione, è necessario considerare che la stimolazione magnetica introduce, indipendentemente dall'intensità, artefatti molto invasivi, il cui trattamento non è banale. Durante l'analisi delle componenti indipendenti (ICA) sono state individuate numerose componenti classificate come artefatti muscolari, soprattutto all'aumentare dell'intensità dello stimolo. Un buon posizionamento della bobina è essenziale affinchè l'erogazione dello stimolo non coinvolga anche altri tessuti eccitabili, come i muscoli facciali. La stimolazione sopra-soglia in particolare è stata giudicata più intensa a livello sensoriale proprio per la contrazione dei muscoli situati in prossimità della bobina. A causa della presenza dello stimolo, è stata analizzata una finestra temporale in cui gli effetti della stimolazione sono già in fase di diminuzione. Di conseguenza, la stabilità della sincronizzazione è stata valutata come attività residua della stimolazione, più che come risposta diretta. Ciò potrebbe aver influenzato, ad esempio, l'analisi delle connessioni del sito stimolato che, come mostrato, non ha evidenziato incrementi significativi. Inoltre, l'intero studio dipende dalle scelte effettuate nella stima delle serie temporali nello spazio sorgente, in particolare nella definizione delle ROI. L'utilizzo di parcellizzazioni troppo ampie può infatti condurre a un eccessivo smoothing del segnale, con conseguente perdita di informazione. Questo effetto è stato osservato confrontando le metriche globali: nella parcellizzazione a 7 network non sono emerse differenze significative, al contrario della parcellizzazione più fine a 17 network. Un altro limite, riguarda l'applicazione di una soglia per classificare una connessione reale o rumorosa/spuria nelle matrici di adiacenza. Il problema è stato già sollevato in alcuni studi, i quali dimostrano come non esista un metodo esatto e sicuro per applicare una soglia, tale da rendere significativi gli effetti nelle metriche utilizzate per studiare le varie reti[1]. In conclusione, l'analisi svolta può essere considerata un contributo allo studio delle reti cerebrali mediante l'impiego combinato di TMS ed EEG. Naturalmente, sono possibili ulteriori miglioramenti nelle procedure adottate. Si potrebbero ad esempio valutare differenti indici per stimare la connessione funzionale tra due aree, oppure esplorare altre tipologie di connettività. Esistono ulteriori approcci che, combinati tra loro, potrebbero fornire una descrizione ancora più completa della dinamica dei network cerebrali.

Nonostante i grandi progressi compiuti nell'ambito delle neuroscienze, il cervello umano continua a mostrare aspetti ancora avvolti nel mistero, soprattutto per quanto riguarda le modalità con cui le diverse regioni comunicano e cooperano tra loro. In

questo percorso di scoperta, la tecnologia svolge un ruolo centrale: il suo costante avanzamento rappresenta la condizione necessaria per avvicinarsi a una comprensione sempre più profonda dell'attività cerebrale e delle sue molteplici sfaccettature. L'auspicio è che gli strumenti e le metodologie sviluppate e perfezionate negli anni a venire possano contribuire a svelare ciò che ancora sfugge, permettendo di esplorare con maggiore chiarezza la complessità del cervello umano.

Bibliografia

- [1] Timofey Adamovich et al. «The thresholding problem and variability in the EEG graph network parameters». In: *Scientific Reports* 12.1 (2022), p. 18659.
- [2] Laura Astolfi et al. «Comparison of Different Cortical Connectivity Estimators for High-Resolution EEG Recordings». In: *Human Brain Mapping* 28.2 (2007), pp. 143–157.
- [3] Mark W. Barnett e Philip M. Larkman. «The Action Potential». In: *Practical Neurology* 7.3 (2007), pp. 192–197.
- [4] Danielle S Bassett e Olaf Sporns. «Network neuroscience». In: *Nature neuroscience* 20.3 (2017), pp. 353–364.
- [5] J. Gordon Betts et al. «12.5 Communication Between Neurons». In: *Anatomy and Physiology* 2e. 2022.
- [6] Ricardo Bruña, Fernando Maestú e Ernesto Pereda. «Phase locking value revisited: teaching new tricks to an old dog». In: *Journal of neural engineering* 15.5 (2018), p. 056011.
- [7] Jun Cao et al. «Brain functional and effective connectivity based on electroencephalography recordings: A review». In: *Human brain mapping* 43.2 (2022), pp. 860–879.
- [8] Marco Catani e D H Ffytche. «The rises and falls of disconnection syndromes». English. In: *Brain* 128.10 (ott. 2005), pp. 2224–2239.
- [9] Zhi-De Deng, Sarah H Lisanby e Angel V Peterchev. «Electric field depth–focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: simulation comparison of 50 coil designs». In: *Brain stimulation* 6.1 (2013), pp. 1–13.
- [10] DH Fender. «Source localization of brain electrical activity». In: *Handbook of electroencephalography and clinical neurophysiology* (1987), pp. 355–403.
- [11] Peter T Fox et al. «Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity». In: *Science* 241.4864 (1988), pp. 462–464.

Bibliografia

- [13] Matthew F Glasser et al. «A multi-modal parcellation of human cerebral cortex». In: *Nature* 536.7615 (2016), pp. 171–178.
- [14] Patricia S Goldman-Rakic. «Topography of cognition: parallel distributed networks in primate association cortex.» In: *Annual review of neuroscience* (1988).
- [15] Alexandre Gramfort et al. «MEG and EEG Data Analysis with MNE-Python». In: *Frontiers in Neuroscience* 7.267 (2013), pp. 1–13.
- [16] Ane Miren Gutiérrez-Muto et al. «The complex landscape of TMS devices: A brief overview». In: *Plos one* 18.11 (2023).
- [17] Matti S Hämäläinen e Risto J Ilmoniemi. «Interpreting magnetic fields of the brain: minimum norm estimates». In: *Medical & biological engineering & computing* 32.1 (1994), pp. 35–42.
- [18] Ying-Zu Huang et al. «Theta burst stimulation of the human motor cortex». In: *Neuron* 45.2 (2005), pp. 201–206.
- [19] Kinaan Javed et al. «Neuroanatomy, wernicke area». In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2023.
- [20] Eric R. Kandel. «Nerve Cells and Behavior». In: *Scientific American* 223.1 (1970), pp. 57–71.
- [21] Da-Hye Kim et al. «Analysis of time-dependent brain network on active and mi tasks for chronic stroke patients». In: *Plos one* 10.12 (2015).
- [22] Jean-Philippe Lachaux et al. «Measuring phase synchrony in brain signals». In: *Human brain mapping* 8.4 (1999), pp. 194–208.
- [23] Goran Lantz et al. «Epileptic source localization with high density EEG: how many electrodes are needed?» In: *Clinical neurophysiology* 114.1 (2003), pp. 63–69.
- [24] Ronald M Lazar e JP Mohr. «Revisiting the contributions of Paul Broca to the study of aphasia». In: *Neuropsychology review* 21.3 (2011), pp. 236–239.
- [25] Dietrich Lehmann e Wolfgang Skrandies. «Reference-free identification of components of checkerboard-evoked multichannel potential fields». In: *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 48.6 (1980), pp. 609–621.
- [26] Marios Loukas et al. «Korbinian Brodmann (1868-1918) and his contributions to mapping the cerebral cortex». In: *Neurosurgery* 68.1 (2011), pp. 6–11.

- [27] M-Marchsel Mesulam. «A cortical network for directed attention and unilateral neglect». In: *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 10.4 (1981), pp. 309–325.
- [28] Christoph M Michel et al. «EEG source imaging». In: *Clinical neurophysiology* 115.10 (2004), pp. 2195–2222.
- [29] Seiji Ogawa et al. «Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging.» In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.13 (1992), pp. 5951–5955.
- [30] J Matias Palva et al. «Ghost interactions in MEG/EEG source space: A note of caution on inter-areal coupling measures». In: *Neuroimage* 173 (2018), pp. 632–643.
- [31] Roberto D Pascual-Marqui, Christoph M Michel e Dietrich Lehmann. «Low resolution electromagnetic tomography: a new method for localizing electrical activity in the brain». In: *International Journal of psychophysiology* 18.1 (1994), pp. 49–65.
- [32] Roberto Domingo Pascual-Marqui et al. «Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details». In: *Methods find exp clin pharmacol* 24 Suppl D (2002), pp. 5–12.
- [33] J. M. S. Pearce. «Historical note: Brodmann's cortical maps». In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76 (2005), p. 259.
- [34] Christophe Phillips, Michael D Rugg e Karl J Friston. «Systematic regularization of linear inverse solutions of the EEG source localization problem». In: *NeuroImage* 17.1 (2002), pp. 287–301.
- [35] Marcus E Raichle. «A brief history of human brain mapping». In: *Trends in neurosciences* 32.2 (2009), pp. 118–126.
- [36] Simone Rossi et al. «Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research». In: *Clinical neurophysiology* 120.12 (2009), pp. 2008–2039.
- [37] Mikail Rubinov e Olaf Sporns. «Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations». In: *Neuroimage* 52.3 (2010), pp. 1059–1069.

Bibliografia

- [38] V. Sakkalis. «Review of advanced techniques for the estimation of brain connectivity measured with EEG/MEG». In: *Computers in Biology and Medicine* 41.12 (2011). Special Issue on Techniques for Measuring Brain Connectivity, pp. 1110–1117.
- [39] Stewart Shipp. «Structure and Function of the Cerebral Cortex». In: *Current Biology* 17.12 (2007), R443–R449.
- [40] Abbas Sohrabpour et al. «Noninvasive electromagnetic source imaging and granger causality analysis: an electrophysiological connectome (eConnectome) approach». In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 63.12 (2016), pp. 2474–2487.
- [41] Olaf Sporns. «Graph theory methods: applications in brain networks». In: *Dialogues in clinical neuroscience* 20.2 (2018), pp. 111–121.
- [42] C.L. Stanfield. *Fisiologia*. Edises, 2017. ISBN: 9788879599726.
- [43] Taban Fami Tafreshi, Mohammad Reza Daliri e Mahrad Ghodousi. «Functional and effective connectivity based features of EEG signals for object recognition». In: *Cognitive neurodynamics* 13.6 (2019), pp. 555–566.
- [44] Michal Teplan et al. «Fundamentals of EEG measurement». In: *Measurement science review* 2.2 (2002), pp. 1–11.
- [45] Lauren Thau, Vamsi Reddy e Paramvir Singh. *Anatomy, Central Nervous System*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025.
- [46] Keith R Thulborn et al. «Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field». In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 714.2 (1982), pp. 265–270.
- [47] Shoogo Ueno e Masaki Sekino. «Figure-eight coils for magnetic stimulation: from focal stimulation to deep stimulation». In: *Frontiers in human neuroscience* 15 (2021), p. 805971.
- [48] David C Van Essen et al. «The Human Connectome Project: a data acquisition perspective». In: *Neuroimage* 62.4 (2012), pp. 2222–2231.
- [49] Pieter Van Mierlo et al. «Functional brain connectivity from EEG in epilepsy: Seizure prediction and epileptogenic focus localization». In: *Progress in neurobiology* 121 (2014), pp. 19–35.

- [50] Timothy Wagner, Antoni Valero-Cabre e Alvaro Pascual-Leone. «Noninvasive human brain stimulation». In: *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 9.1 (2007), pp. 527–565.
- [51] Gagan S. Wig, Bradley L. Schlaggar e Steven E. Petersen. «Concepts and principles in the analysis of brain networks». In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1224.1 (2011), pp. 126–146.
- [52] BT Thomas Yeo et al. «The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity». In: *Journal of neurophysiology* (2011).

Sitografia

- [12] FreeSurfer Wiki. *FsAverage*. 2025. URL: <https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/FsAverage>.