

Cover Letter



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE, CHIRURGICHE E
NEUROSCIENZE



UOSA Neurologia Sperimentale

Responsabile: Prof. Nicola De Stefano

Cambiamenti precoci della connettività cerebrale nel Glaucoma Primario ad Angolo Aperto

Paolo Frezzotti *', Antonio Giorgio *'. Francesca Toto ', Alessandro De Leucio
Nicola De Stefano '

Dip. Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università di Siena, Italia

Titolo **running**: Cambiamenti precoci della connettività nel Glaucoma

Corresponding author:

Nicola De Stefano, MD PhD

Professore di Neurologia

Dip. Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze

Università di Siena

Viale Bracci 2, 53100 Siena

Tel. +39-0577-233260

Fax+39-0577-233411

**Word count: Abstract 391; body of the manuscript: 5137
Character count: Title 66; Running title: 38 Number of
references: 51 Number of figures: 5**

Abstract

Contesto. Le opere precedenti hanno fornito la prova della neurodegenerazione del sistema visivo centrale nel Glaucoma Primario ad Angolo Aperto (GPAA), una delle principali cause di cecità irreversibile in tutto il mondo. Recentemente, l'uso di tecnologie avanzate di risonanza magnetica per immagini (MRI) ha dimostrato l'alterazione della connettività cerebrale ed atrofia della materia grigia (MG) e del sistema visivo in pazienti con grave GPAA.

Metodi e risultati. Per valutare ulteriormente se questi diffusi cambiamenti cerebrali possono essere trovati nel GPAA e sono solo un fenomeno tardivo o se potrebbero essere rilevati sin dalla fase iniziale, abbiamo utilizzato la risonanza magnetica per immagini multimodale **by modelling** misure di connettività anatomica lungo i tratti della sostanza bianca (SB) con quelli dei volumi regionali della materia grigia (MG) e la connettività funzionale delle reti degli stati di riposo. Abbiamo studiato 57 pazienti con tutte le fasi del GPAA e 29 pazienti studiati con controlli normali per età e sesso. I pazienti sono stati classificati in tre gradi di gravità, secondo la classificazione di Hodapp e dell'Istituto Bascom Palmer. L'inferenza statistica in base ai voxel è stata eseguita con il test non parametrico di permutazione. Rispetto ai controlli normali, anomalie della connettività anatomica sono state trovate in tutto il gruppo di pazienti con GPAA lungo il percorso visivo e nei tratti non visivi della SB ($p < 0.001$ per entrambi). Inoltre, i pazienti con GPAA hanno mostrato una diminuzione della connettività funzionale nelle regioni della vista ($p = 0.004$) e nelle reti della memoria di lavoro ($p < 0.001$) mentre un aumento era presente nelle regioni della modalità predefinita ($p = 0.002$) e nelle reti subcorticali ($p < 0.001$). Anomalie di entrambe le connettività anatomica e funzionale erano già presenti nei pazienti con GPAA precoce ($n = 14$), rispetto ai controlli normali, nelle regioni di entrambi i sistemi visivi e non visivi ($p < 0.01$ per entrambi). Solo i pazienti con GPAA grave ($n = 30$) hanno mostrato atrofia della MG rispetto ai controlli normali e questo è stato mappato nella corteccia visiva ($p < 0.001$) e nell'ippocampo ($p < 0.001$). La progressione del GPAA è stata associata ad un peggioramento della connettività anatomica sia nella regione visiva sia non visiva ($p < 0.001$ per entrambi), all'atrofia progressiva nell'ippocampo e nelle regioni della corteccia frontale ($p < 0.003$ per entrambi). La maggior parte delle alterazioni strutturali e funzionali all'interno e all'esterno del sistema visivo hanno mostrato una significativa correlazione (p **tra/da** 0.001 a 0.02) con gli occhi meno performanti con il campo visivo computerizzato e con lo spessore dello strato delle fibre nervose retiniche.

Conclusioni. In generale, i nostri risultati suggeriscono che la complessa patogenesi del GPAA include *widespread WM microstructural damage of* connettività anatomica ed un'alterata connettività funzionale della materia grigia all'interno e all'esterno del sistema visivo sin dalla fase iniziale della malattia. L'associazione *of brain MRI changes with measures of visual severity* sottolinea la rilevanza clinica dei presenti risultati.

Parole chiave: glaucoma, risonanza magnetica per immagini (MRI), risonanza magnetica funzionale, atrofia, tensore di diffusione (DTI), atrofia cerebrale, neurodegenerazione, malattia di Alzheimer

Introduzione

Il glaucoma è una delle principali cause di cecità in tutto il mondo. Un ruolo chiave nella patogenesi di questa malattia è attribuita alla degenerazione delle cellule gangliari retiniche, che porta progressivamente danni al campo visivo e, senza una terapia appropriata, ad una cecità bilaterale e irreversibile [1]. Il danno alle proiezioni assionali delle cellule gangliari della retina (RGC) è dovuto dall'assottigliamento dello strato di fibre nervose retiniche (RNFL) del nervo ottico, che può essere valutato in maniera non invasiva attraverso la tomografia a coerenza ottica (OCT) [2]. L'assottigliamento degli assoni delle RGC è stato collegato a una serie di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la sclerosi multipla [3]. In effetti, la retina condivide le funzioni dello sviluppo, quelle fisiologiche e anatomiche con il cervello [4].

Il glaucoma primario ad angolo aperto (GPAA) è il tipo più comune di glaucoma nella popolazione caucasica. Anche se l'esatta fisiopatologia del GPAA non è ancora del tutto chiara [5], recenti studi sulla risonanza magnetica per immagini (MRI) avanzata hanno dimostrato che il danno tissutale legato al GPAA potrebbe non essere limitato alle cellule gangliari della retina. In effetti, cambiamenti nella sostanza bianca (SB) e nella materia grigia (MG) sono stati trovati in tutto il sistema visivo centrale di pazienti con GPAA [6-10], mettendo in discussione l'idea che la degenerazione della retina sia l'unico substrato neuropatologico di questo disturbo visivo. Inoltre, un piccolo studio pilota sulla MRI su 13 pazienti con grave GPAA ha recentemente dimostrato modifiche cerebrali microstrutturali, atrofiche e funzionali all'interno e all'esterno del sistema visivo [11], suggerendo che nel GPAA il processo neurodegenerativo potrebbe non essere limitato al sistema visivo, ma coinvolgere anche altri sistemi cerebrali come avviene in condizioni tipiche neurodegenerative. In linea con quanto appena detto, la prova di uno stretto legame tra il glaucoma e la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica e la malattia di Parkinson sono stati riportati in una serie di recenti studi sperimentali [12] e la prevalenza del glaucoma sembra essere molto più alta nei pazienti con malattia di Alzheimer rispetto alla popolazione normale [13]. Noi ipotizziamo che una significativa ed estesa neurodegenerazione potrebbe verificarsi nel glaucoma, diffondendosi in tutto il cervello in modo simile alle condizioni neurodegenerative tipiche [14].

In questo contesto, abbiamo studiato una popolazione di pazienti che copre le diverse fasi del GPAA con lo scopo di valutare: i) se i danni ai tessuti possono realmente avvenire all'interno e all'esterno del sistema visivo; ii) se questo è solo un evento tardivo o può essere trovato, magari con diversi gradi, anche nella fase precoce della malattia; iii) se il danno tissutale che si verifica all'interno e all'esterno del sistema visivo in diversi stadi della malattia è di rilevanza clinica. Abbiamo pertanto studiato la presenza di danni cerebrali in pazienti affetti da GPAA utilizzando la risonanza magnetica multimodale (RMI) e misure **modeled** di connettività anatomica lungo tratti della materia bianca con quelle dei volumi regionali della materia grigia e della connettività funzionale delle reti degli stati di riposo. Inoltre, abbiamo valutato la rilevanza clinica dei cambiamenti cerebrali correlando le misure della (RMI) con misure classiche oftalmologiche.

Materiali e metodi

Materie di studio

Sono stati arruolati 86 soggetti, dei quali 57 pazienti con GPAA (Tabella 1) e 29 controlli normali (NC, 15 maschi e 14 femmine, età = 58 ± 10 anni). I pazienti sono stati reclutati tra coloro che sono stati refertati al Centro Glaucoma dell'Università degli Studi di Siena e coloro che sono stati classificati con GPAA in presenza di un'anomala testa del nervo ottico, perdita del campo visivo di tipo glaucomatoso, angolo aperto al gonioscopio, e nessuna apparente causa clinica secondaria di glaucoma. Tutti i pazienti erano in trattamento farmacologico per il glaucoma all'inizio dello studio. I criteri di inclusione per i pazienti GPAA erano: età compresa tra i 40 e gli 80 anni, spessore corneale tra 520 e 580 μm (micrometri), danno glaucomatoso al nervo ottico e danno glaucomatoso del campo visivo. Tutti i pazienti avevano difetti del campo visivo che erano riproducibili su test multipli ripetuti. I criteri di esclusione, invece, erano l'età > 80 anni, qualsiasi disturbo oculare diverso dal glaucoma, qualsiasi disturbo neurologico (documentato clinicamente e

strumentalmente), e l'uso di farmaci che possono influenzare il campo visivo. I pazienti con GPAA sono stati classificati secondo la classificazione di Hodapp e dell'Istituto Bascom Palmer [15].

I soggetti del gruppo di controllo normale sono stati reclutati tra i lavoratori di laboratorio e ospedalieri, con normali esami neurologici ed oftalmologici e senza una storia clinica di disturbi neurologici od oftalmologici.

Lo studio ha ricevuto l'approvazione da parte del Comitato Etico locale (Azienda Ospedaliera Universitaria Senese). Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i soggetti prima dell'ingresso nello studio.

Acquisizione MRI

In tutti i soggetti la risonanza magnetica (MRI) cerebrale è stata svolta presso il Centro NMR dell'Università di Siena tramite Tesla Philips Gyroscan 1.5 (Philips Medical Systems, Best, Paesi Bassi). Un'immagine sagittale del sondaggio è stato utilizzata per identificare le commisure anteriore e posteriore. Le sequenze sono state acquisite sul piano assiale parallelo alla linea commesurale. Una doppia eco, una sequenza turbo spin-ech (tempo di ripetizione [TR] / tempo echo [TE] 1 / TE 2 = 2075/30/90 ms (millisecondo), la dimensione dei voxel = 1 x 1 x 3 mm) densità protonica (PD) ceduta ed immagini T2-W. I dati del DTI consistevano di echo-planar imaging (EPI) (TR = 8500 ms; TE = 100 ms; dimensione voxel = 2.5 mm³), con *diffusion weighting* distribuita in 32 direzioni e b-value = 1000 sec*mm⁻². I dati sulla fMRI a riposo erano 190 volumi della sequenza EPI con TR = 1000 ms, TE = 50 ms, dimensione voxel = 3.75 x 3.75 x 6 mm. Un'immagine T1-pesata ad alta risoluzione (TR = 25 ms, TE = 4,6 ms, dimensione voxel = 1 mm³) è stata acquisita con la registrazione di immagini, mappatura anatomica e con l'analisi del volume della MG.

MRI e analisi dei dati della fMRI a riposo

È stato eseguita con strumenti della Libreria software per la risonanza magnetica funzionale (FSL, www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/) [16]

Microstruttura lungo i tratti della SB

È stata valutata attraverso l'analisi in base ai voxel dei dati del DTI utilizzando la versione 1.2 *Tract-Based Spatial Statistics* (TBSS) [17]. In primo luogo, i dati del DTI sono stati corretti per le correnti parassite della MRI ed il movimento della testa mediante registrazione affine a un volume di riferimento, vale a dire il volume senza *diffusion weighting* ($b = 0$). In secondo luogo, le immagini di anisotropia frazionaria (FA), diffusività assiale (AD) e diffusività radiale (RD) sono state create inserendo un modello tensore ai dati grezzi DTI utilizzando FDT (FMRIB Diffusione Toolbox) [18] e poi *brain-extracted* utilizzando il BET (Strumento di estrazione del cervello) [19]. Tutti i dati sulla FA dei soggetti sono poi stati allineati in uno spazio standard comune (FMRIB58_FA) utilizzando FNIRT (FMRIB Strumento di Registrazione Non lineare delle Immagini) [20]. Successivamente, l'immagine della FA media è stata creata e diluita per creare uno scheletro della FA media (limitata alla $FA > 0.2$), che rappresenta i centri di tutti i tratti della SB comuni al gruppo di studio, evitando così di prendere in considerazione i voxel ai bordi dei tratti, che potrebbero soffrire di effetti parziali di volume. I dati allineati sulla FA di tutti i soggetti studiati sono stati poi proiettati su questo scheletro di SB. TBSS è stato applicato anche agli altri dati DTI-derivati (cioè, AD e RD). Per realizzare questo, abbiamo utilizzato immagini FA di registrazione non lineare, scheletrizzazione e fasi di proiezione. Il risultato dei dati proiettati (sullo scheletro medio della SB) di tutte le immagini DTI è stato infine inserito nelle statistiche di gruppo in base ai voxel. Vedi il paragrafo Statistiche per i dettagli.

Volume della materia grigia

L'analisi è stata eseguita con la versione 1.1 FSL-VBM [21], che utilizza un protocollo ottimizzato VBM [22]. In primo luogo, le immagini T1-W di tutti i soggetti dello studio erano *brain-extracted*

tramite BET [19] e GM-segmentate [23] prima di essere registrate sullo spazio standard MNI152 usando FNIRT [20]. Le immagini risultanti sono state mediate per creare un modello della MG simmetrico e specifico per lo studio. In secondo luogo, tutte le immagini native della MG sono state registrate in modo non lineare su questo modello e "modulate" per correggere l'espansione o la contrazione locale dovuta alla componente non lineare della trasformazione spaziale. Le immagini della MG modulate sono state poi levigate con un kernel gaussiano isotropico con una sigma di 3 mm. Grazie all'utilizzo di dati modulati, è stata ottenuta la quantità assoluta (volume) di MG [22]. Vedi il paragrafo Statistiche per l'analisi in base ai voxel del volume di MG.

Connettività funzionale nelle reti degli stati di riposo (RSN)

L'analisi è stata effettuata sull'intero cervello utilizzando l'analisi probabilistica delle componenti indipendenti (PICA) [24] di MELODIC (*multivariate exploratory linear decomposition into independent components*). I dati pre-trattati sono stati temporalmente concatenati tra i soggetti per creare un unico dataset in 4D. Tale insieme di dati era varianza-normalizzato e poi scomposto in una serie di 27 componenti indipendenti (IC), dove il numero delle dimensioni è stato stimato automaticamente mediante l'operatore approssimato di Laplace *to the Bayesian evidence of the model order* [24]. I IC di interesse sono stati selezionati mediante ispezione visiva e dal confronto con le reti degli stati di riposo (RSNs), precedentemente definite [25]. Le restanti IC rappresentavano il rumore fisiologico (cardiaco, respiratorio, pulsazioni del liquido cerebrospinale, movimento della testa), errata registrazione e manufatti legati allo scanner e quindi scartati prima di ulteriori elaborazioni. Infine, l'analisi in base ai voxel dei dati sulla fMRI a riposo è stata eseguita utilizzando il metodo della *dual-regression* [26]. Vedi il paragrafo Statistiche per i dettagli.

Misurazioni del campo visivo

Nei pazienti con GPAA, almeno due affidabili perimetrie automatizzate standard (SAP) del campo visivo sono state registrate utilizzando l'Analizzatore Humphrey (Cari Zeiss Meditec, Dublino, CA, USA) *running* il programma 30-2 SITA (*Swedish Interactive Threshold Algorithm*)-Standard, un metodo standard per l'esame dei 30° centrali del campo visivo. In questo tipo di misurazione, il

soggetto si trova di fronte una sfera bianca illuminata, sulla quale lampeggiano ad intermittenza dei punti di luce con intensità variabile. I soggetti rispondono quando percepiscono il flash. La sensibilità in ogni posizione nel campo visivo è determinata dalla variazione dell'intensità del flash delle presentazioni successive. Ogni occhio è misurato indipendentemente in modo che un occhio è coperto mentre l'altro viene esaminato. Questo test fornisce alcuni indici del campo visivo come: i) Deviazione Media (MD), che si riferisce alla deviazione media della sensibilità in ciascuna posizione del test adeguando i valori della popolazione normale in base all'età, fornendo un'indicazione del grado di perdita complessiva nel campo visivo; ii) Deviazione Standard Pesata (PSD), che è una misura sintetica della deviazione media dei valori individuali della sensibilità del campo visivo dall'inclinazione normale dopo la correzione delle differenze complessive di sensibilità; e iii) Indice del campo visivo (VFI), una nuova misura mondiale che rappresenta l'intero campo visivo in percentuale. I risultati delle SAP anormali sono stati definiti come difetti tipici glaucomatosi con una PSD significativamente aumentata oltre il livello del 5% e/o un Glaucoma Hemifield Test risultato al di fuori dei limiti normali.

Tomografia a Coerenza Ottica (OCT)

Lo spessore dello RNFL peripapillari è stato misurato utilizzando *the Optic Disc Cube 200x200 scanning protocol* della OCT Cirrus (Cari Zeiss Meditec, Dublino, CA, USA). Per l'acquisizione delle immagini, le immagini a scansione laser sono state focalizzate dopo che i soggetti si erano seduti e posizionati correttamente. La OCT è basata sulla luce, che a differenza delle onde sonore utilizzate nell'ecografia B-mode non richiede un contatto con il tessuto da esaminare. La OCT misura il ritardo nell'*echo* e l'intensità della luce diffusa, ossia la luce riflessa dalla microstruttura del tessuto, utilizzando una lunghezza d'onda di circa 820 nm. L'immagine viene catturata in pochi secondi e richiede l'immobilità dal paziente. Le strutture visualizzate sono il risultato di un assorbimento selettivo e di una riflessione selettiva dalla struttura o dall'interfaccia illuminata dal laser. Questo può dipendere dal tipo di strutture (le più riflettenti si trovano nello RNFL), e dalla direzione del raggio incidente (quando le strutture sono perpendicolari al raggio, la riflettività è maggiore, indicato in rosso nelle immagini della OCT).

Statistiche

Per quanto riguarda le statistiche generali, le differenze di età, i parametri del movimento della testa durante l'acquisizione della fMRI a riposo tra i pazienti con GPAA ed i controlli normali sono stati esaminati con il test Mann-Whitney. Il test di Fisher è stato utilizzato per i confronti tra i gruppi in base al sesso, grado di iperintensità della SB, presenza/assenza di ipertensione. I dati sono stati considerati significativi con $p < 0.05$. SPSS è stato utilizzato per eseguire le analisi statistiche.

Per quanto riguarda l'analisi in base ai voxel delle misure del DTI, il volume della MG e la connettività RSN-funzionale, i confronti tra i pazienti con GPAA ed i controlli normali e le correlazioni con lo stadio della malattia e le misure oftalmologiche (campo visivo e RNFL) nell'occhio meno performante di tutti i pazienti sono state effettuate nel quadro del modello lineare generalizzato (GLM) con, rispettivamente, t-test spaiati e analisi della regressione utilizzando *FSL randomise*, un test non parametrico di permutazione (5000 permutazioni). Il livello di significatività per tutte le analisi è fissato a $p < 0.005$, non corretto, dimensione del cluster ≥ 50 voxel utilizzando TFCE (*Threshold-Free Cluster Enhancement*). Successivamente, al fine di confermare

ulteriormente i nostri risultati abbiamo calcolato all'interno di cluster significativi *of between-group comparisons mean values across all voxels in each subject* e analisi della varianza applicata, utilizzando il metodo Bonferroni per la correzione delle comparazioni multiple. Inoltre, la correlazione non parametrica di Spearman è stata utilizzata per quantificare in tutti i pazienti con GPAA la forza della correlazione in cluster di anomalie cerebrali con misure di stadio della malattia e misure oftalmologiche negli occhi meno performanti. In tutte le analisi, età, sesso, grado di iperintensità della SB, presenza/assenza di ipertensione sono state utilizzate come covariate.

Le regioni della SB e della MG corrispondenti ai massimi locali all'interno di cluster significativi sono stati anatomicamente mappati usando *standard-space atlases* forniti da FSL (*JHU DTI-based white matter atlases for WM; Harvard-Oxford cortical/subcortical structural atlases for GM*).

Risultati

Generale

Tutti i pazienti avevano il GPAA bilaterale e caratteristiche cliniche degli occhi meno performanti così come quelle demografiche sono riportate nella Tabella 1. Secondo la classificazione di Hodapp e dell'Istituto Bascom Palmer, i pazienti con GPAA avevano una malattia precoce (stadio 1, n = 14), moderata (stadio 2, n = 13) e grave (stadio 3, n = 30).

Non sono state riscontrate differenze significative tra i pazienti con GPAA ed i controlli normali in termini di età ($p = 0.1$), sesso ($p = 0.24$), insorgenza di ipertensione (30% vs 25%, $p = 0.61$) e la risonanza magnetica per iperintensità della SB, valutata con la scala Fazekas [27] (grado 0: 70% vs 73%, $p = 0.9$; grado 1: 25% vs 24%, $p = 0.9$; grado 2: 5% vs 3%, $p = 0.9$; nessun grado 3 in entrambi i gruppi).

Comparazioni tra pazienti con GPAA ed i controlli normali

Microstruttura lungo i tratti della SB

All'analisi TBSS sull'intero cervello (Fig. 1A e Tabella 2), i pazienti con GPAA hanno mostrato una minore FA rispetto ai controlli normali lungo il percorso visivo (0.35 ± 0.02 vs 0.40 ± 0.02 , $p < 0.001$), ossia nei tratti ottici, mappatura delle radiazioni ottiche sul fascicolo fronto-occipitale inferiore (IFOF) e fascicolo longitudinale inferiore (ILF), e nella SB adiacente alla corteccia occipitale laterale, contenente fibre dall'ILF. I pazienti con GPAA hanno anche mostrato una AD superiore ai controlli normali lungo il percorso visivo nei tratti ottici e nelle radiazioni ottiche (IFOF) (1.85 ± 0.15 vs 1.68 ± 0.12 mm² / sec, $p < 0.001$). L'analisi TBSS ha mostrato anomalie del DTI in pazienti con GPAA anche al di là del percorso visivo. In particolare, c'era una minore FA (0.46 ± 0.04 vs 0.52 ± 0.03 , $p < 0.001$) nel fascicolo longitudinale superiore (SLF, regione parietale) e una maggiore AD (1.05 ± 0.05 vs 0.95 ± 0.05 mm² / sec, $p < 0.001$) nel SLF (regione temporale), la SB del giro sopramarginale e il lobulo parietale superiore, contenente fibre dal SLF.

Per verificare se le anomalie microstrutturali lungo i tratti della SB erano presenti nelle prime fasi della malattia, è stata eseguita un'analisi di sottogruppo su pazienti con GPAA allo stadio-1. I risultati hanno mostrato una FA inferiore e una AD superiore su tutto il cervello in questo sottogruppo di pazienti rispetto ai controlli normali. Similmente a tutta la popolazione con GPAA, anomalie sono state mappate lungo il percorso visivo (FA: 0.45 ± 0.02 vs 0.49 ± 0.02 , $p < 0.001$;

AD: 1.30 ± 0.04 vs 1.21 ± 0.03 mm² / sec, p 0.001) ed oltre il percorso visivo (AD: 1.10 ± 0.01 vs 1 ± 0.006 mm² / sec, p 0.001) (vedere Fig. 1B e la Tabella 3 per i dettagli)

Volume della materia grigia

Nessuna differenza nel volume della MG è stata riscontrata tra l'intero gruppo di pazienti con GPAA ed i controlli normali. Tuttavia, quando l'analisi è stata ristretta al sottogruppo di pazienti con malattia grave (stadio-3 GPAA), i risultati hanno mostrato un minore volume della MG nelle regioni legate alla vista (giro fusiforme occipitale e corteccia laterale occipitale [superiore]; 508 ± 90 mm³ vs 603 ± 75 mm³, p < 0.001) e nell'ippocampo (337 ± 37 mm³ vs 391 ± 42 mm³, p < 0.001) (Fig. 2 e Tabella 4).

Connettività funzionale nelle reti degli stati di riposo

Nessuna differenza è stata riscontrata tra i pazienti con GPAA ed i controlli normali nei parametri sul movimento della testa durante l'acquisizione della fMRI a riposo (spostamento relativo: 0.08 ± 0.05 mm vs 0.08 ± 0.07 mm, p = 0.68; spostamento assoluto: 0.28 ± 0.13 mm vs. 0.30 ± 0.23 mm, p = 0.18). La PICA sull'intero cervello della popolazione studiata ha definito 13 RSN funzionalmente rilevanti, inclusa la rete visiva, uditiva, sensomotoria, della modalità predefinita (anteriore e posteriore), memoria di lavoro (destra e sinistra), fronto-mediale e orbitofrontale, controllo esecutivo, *salience network*, sottocorticale, polo temporale. Quattro di queste RSN hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi in termini di connettività funzionale (Fig. 3A e Tabella 5). In particolare, i pazienti con GPAA avevano una minore connettività funzionale nella rete visiva (17.16 ± 10.41 vs 25.9 ± 14.8 , p = 0.002) e nella rete della memoria di lavoro (7.48 ± 5.35 vs 13.45 ± 6.34 , p < 0.001). Viceversa, i pazienti con GPAA avevano una connettività funzionale più elevata nella rete della modalità predefinita rispetto ai controlli normali (12.67 ± 8.76 vs 5.93 ± 10.74 , p = 0.002) e nella rete sottocorticale (15.13 ± 7.23 vs 8.68 ± 6.74 , p < 0.001).

Analogamente alla connettività anatomica, anomalie nella connettività funzionale erano già presenti nel sottogruppo di pazienti con GPAA allo stadio-1. In particolare, livelli più bassi sono stati trovati in diverse RSN, tra cui la rete visiva (29.8 ± 10.47 vs 45.63 ± 31.91 , p = 0.01), memoria di lavoro (5.77 ± 3.56 vs 11.62 ± 6.63 , p = 0.004 a destra, 8.77 ± 1.32 vs 14.82 ± 0.92 , p = 0.001 a sinistra) e la rete della modalità standard (5.73 ± 4.91 vs 13.78 ± 8.05 , p = 0.001), mentre un livello superiore era presente nella rete sottocorticale (13.79 ± 7.98 vs 8.12 ± 6.40 , p = 0.016) (vedi Fig. 3B e la Tabella 6 per i dettagli).

Correlazioni tra le anomalie cerebrali e gli stadi del Glaucoma

Le correlazioni in base ai voxel sono state trovate tra alcune delle anomalie strutturali in tutto il cervello e aumentando lo stadio del GPAA (Fig. 4 e la Tabella 7).

Per quanto riguarda il sistema visivo, c'era un peggioramento nella microstruttura della SB (FA inferiore e AD superiore) lungo le radiazioni ottiche (IFOF) (r = - 0.55, p < 0.001 per FA; r = 0.43, p 0.001 per AD). All'esterno del sistema visivo, la progressione del GPAA è correlata con una maggiore AD nel SLF (r = 0.56, p < 0.001) e da un minore volume della MG nell'ippocampo e in varie regioni frontali (r = - 0.58, p < 0.001)

Correlazione tra le anomalie cerebrali e le misurazioni oftalmologiche

I valori più bassi nello RNFL hanno mostrato correlazioni in base ai voxel con anomalie nel sistema visivo (Fig. 5 e Tabella 8): una minore FA nelle radiazioni ottiche (ILF) ($r = 0.40$, $p = 0.003$) e un minore volume della MG nella corteccia occipitale laterale (inferiore) ($r = 0.32$, $p = 0.02$). Inoltre, i bassi valori nello RNFL hanno mostrato una correlazione in base ai voxel con anomalie esterne al sistema visivo (Fig. 5 e Tabella 8): minore FA nello splenio del corpo calloso e nella SB del giro postcentrale ($r = 0.50$, $p < 0.001$) e un minore volume di MG nel cervelletto, giro fusiforme temporale, giro inferiore temporale, caudato, giro postcentrale e polo frontale ($r = 0.32$, $p = 0.02$).

Per quanto riguarda il campo visivo, una PSD superiore ha mostrato la correlazione (Fig. 5 e Tabella 8) con una connettività funzionale minore nella rete visiva (corteccia occipitale laterale e giro temporale superiore) ($r = -0.33$, $p = 0.01$).

Discussione

In questo studio sulla MRI multimodale, abbiamo fornito la prova di diffusi cambiamenti cerebrali strutturali e funzionali in una popolazione di pazienti con GPAA che copre tutte le fasi della malattia. È interessante notare che alcuni di questi cambiamenti cerebrali hanno mostrato un rapporto topografico con le misure oftalmologiche ed un peggioramento negli stadi della malattia. Di fondamentale importanza, sia le anomalie strutturali sia quelle funzionali della connettività cerebrale erano presenti anche nel sottogruppo di pazienti allo stadio precoce del GPAA.

Cambiamenti nel sistema visivo

Cambiamenti microstrutturali lungo i tratti della SB

L'intero percorso visivo centrale nel nostro gruppo di pazienti con GPAA ha mostrato anomalie microstrutturali della connettività anatomica, la maggior parte delle quali erano già presenti nella fase iniziale della malattia. Una riduzione dell'anisotropia frazionaria, una misura generale dell'integrità del tratto della SB, e/o l'aumento della diffusività assiale (o parallela), un presunto marcatore di perdita assonale [28] sono stati trovati nei tratti ottici, nelle radiazioni ottiche (fascicolo fronto-occipitale inferiore e fascicolo longitudinale inferiore) e nella SB della corteccia occipitale contenente fibre dalle radiazioni ottiche. I tratti ottici trasportano informazioni retiniche all'intero campo visivo dal chiasma ottico al nucleo genicolato laterale del talamo. Il fascicolo fronto-occipitale inferiore collega rostralmente la corteccia frontale superiore alla corteccia dorsale parietale e alla corteccia occipitale in posizione caudale, tutte le regioni che giocano un ruolo nella funzione visuospatiale. Il fascicolo longitudinale inferiore viaggia tra le cortecce occipitale e temporale anteriore, quindi è coinvolto nella memoria visiva. Le modificazioni del DTI lungo i tratti della SB ha mostrato che il nostro gruppo di pazienti con GPAA è in linea sia con gli studi umani [6, 7] sia sperimentali sul glaucoma [29]. Sono concordanti per la presenza di un danno microstrutturale rilevante nel percorso visivo centrale. Una ulteriore prova arriva da uno studio di spettroscopia protonica di MRI che ha dimostrato una significativa riduzione di N-acetil aspartato e di colina nelle aree striata e genicolo-calcarina del lobo occipitale, consistente, rispettivamente, in un danno/perdita assonale e una riduzione della densità cellulare [30]. La scoperta di cambiamenti microstrutturali lungo le radiazioni ottiche a partire dalla fase iniziale nel nostro gruppo di pazienti con GPAA è in accordo con gli studi sui modelli sperimentali di malattia, in cui uno dei primi eventi patogeni, prima ancora della degenerazione assonale nel nervo ottico e la perdita del corpo delle RGC, è la diminuzione del trasporto assonale attivo dalla retina al cervello [31].

Cambiamenti macroscopici del volume della materia grigia

In termini di volume della MG della corteccia visiva, non abbiamo trovato differenze tra l'intero gruppo di pazienti con GPAA ed i controlli normali. Tuttavia, l'atrofia regionale della MG è stata riscontrata nella fase grave della malattia, che è in linea con i precedenti studi sulla MRI [7, 8, 11, 32]. Atrofia mappata nelle regioni posterolaterali, come il giro fusiforme occipitale e la corteccia occipitale laterale. Il giro fusiforme esercita funzioni cognitive tra cui l'elaborazione delle informazioni sul colore, e il riconoscimento del viso e del corpo. La corteccia laterale occipitale svolge un ruolo importante nel riconoscimento degli oggetti [33]. È interessante notare che, il giro fusiforme occipitale è in stretta relazione anatomica con le radiazioni ottiche, che anzi hanno mostrato anomalie del DTI e questo suggerirebbe la presenza di una degenerazione anterograde transinaptica secondaria *primed* dalla perdita di cellule gangliari della retina, come dimostrato nei modelli animali sperimentali [34] e negli studi post-mortem [35]. Tuttavia, la presenza di un processo neurodegenerativo primario della corteccia visiva, seguito da degenerazione retrograda transinaptica non può essere completamente escluso.

Occorre fare notare che la corteccia associativa visiva è particolarmente suscettibile nel cervello di chi si soffre di Alzheimer per la deposizione di beta-amiloide e di grovigli neurofibrillari [36] e questo risulta correlato con atrofia e metabolismo ridotto nelle regioni occipitali del cervello [37].

Cambiamenti della connettività funzionale nelle reti degli stati di riposo

Il nostro gruppo di pazienti con GPAA ha mostrato una connettività funzionale alterata nella rete visiva, simile ai cambiamenti microstrutturali lungo i tratti della SB, presente anche nel sottogruppo di pazienti allo stadio precoce della malattia. Nei pazienti con disabilità visive e connettività anatomica alterata lungo la rete visiva, la ridotta connettività funzionale nella rete visiva, come riscontrato qui, potrebbe essere secondaria per l'informazione visiva ridotta e/o per la degenerazione trans-sinaptica dei tratti della SB connessi del percorso visivo. La ridotta connettività funzionale nella rete visiva dei pazienti con GPAA è coerente con i recenti studi utilizzando diversi approcci della fMRI a riposo come l'analisi della connettività funzionale dalle regioni di interesse [10], l'ampiezza delle fluttuazioni a bassa frequenza [38], l'omogeneità regionale [39] e le dinamiche temporali di sincronizzazione del cervello [40].

Correlazione dei cambiamenti cerebrali nel sistema visivo con stadi della malattia e misurazioni oftalmologiche

Abbiamo riscontrato nel nostro gruppo di pazienti con GPAA che il peggioramento delle misure del DTI (es. decrescente anisotropia frazionaria e crescente diffusività assiale) lungo le radiazioni ottiche correlato con l'evolversi dello stadio della malattia, suggerisce un accumulo di tempo del danno microstrutturale nella parte posteriore del percorso visivo centrale. Questi risultati sono in generale accordo con gli studi precedenti [41] e dimostrano la potenziale utilità delle misurazioni del DTI come marcatori non invasivi per il monitoraggio della gravità del GPAA.

In termini di rilevanza clinica, l'assottigliamento della retina si è rilevato essere correlato con una minore FA lungo la radiazione ottica e con un'atrofia della corteccia laterale occipitale. Questo risultato non è sorprendente per il fatto che queste strutture sono anatomicamente connesse e confermerebbero la presenza di un "percorso neurodegenerativo" che collega tali regioni cerebrali

all'occhio, con un meccanismo di degenerazione transinaptica anterograda e/o retrograda. Infine, l'alterato campo visivo (deviazione standard pesata aumentata) è risultato essere correlato con la ridotta connettività funzionale in una regione della rete visiva (corteccia laterale occipitale), riflettendo una ridotta integrazione corticale delle informazioni visive e/o un possibile esaurimento dei meccanismi di riorganizzazione funzionale corticale.

Cambiamenti esterni al sistema visivo

Cambiamenti microstrutturali lungo i tratti della SB

I cambiamenti microstrutturali della connettività anatomica sono stati trovati nell'intero gruppo di pazienti con GPAA e nel sottogruppo allo stadio precoce della malattia lungo i tratti della SB che non fanno parte del tipico percorso visivo, ma in qualche modo sono connessi con l'elaborazione visiva, come la porzione parietale del fascicolo longitudinale superiore e la SB del precuneo. Il fascicolo longitudinale superiore rifornisce la corteccia prefrontale con informazioni riguardanti la percezione dello spazio visivo e rifornisce la corteccia parietale (compresi il lobulo parietale superiore ed il precuneo) con le informazioni sulla posizione spaziale delle parti del corpo al fine di disciplinare gli aspetti più complessi del comportamento motorio. È interessante notare, comunque, che i nostri pazienti con GPAA hanno anche mostrato sin dalla fase di malattia precoce anomalie impreviste lungo i tratti della SB non correlati alla funzione visiva e coinvolte nella cognizione come il recupero della memoria episodica (precuneo) e l'elaborazione del linguaggio (parte temporale del fascicolo longitudinale superiore, SB del giro sopramarginale).

Cambiamenti macroscopici del volume della materia grigia

In termini di regioni della MG al di là della corteccia visiva, abbiamo osservato l'atrofia ippocampale solo in pazienti con grave GPAA, in linea con il nostro recente studio pilota sulla MRI [11]. L'ippocampo gioca un ruolo importante nel consolidamento di informazioni dalla memoria a breve termine alla memoria a lungo termine ed anche nell'orientamento spaziale. Infatti, è collegato alle regioni della corteccia visiva come il giro fusiforme, dove l'atrofia era presente nei nostri pazienti con GPAA, oltre alle fibre del fascicolo longitudinale inferiore [42], che hanno rilevato misure alterate del DTI.

Importante, l'ippocampo è una delle prime regioni del cervello di persone con Alzheimer ad essere colpito dalla patologia neurodegenerativa, che comprende la deposizione delle proteine tau intracellulari [grovigli neurofibrillari], beta-amiloide extracellulare ed una progressiva diffusione transinaptica verso altre regioni distanti del cervello [14].

Cambiamenti della connettività funzionale nelle reti degli stati di riposo

All'esterno della tipica rete visiva, abbiamo trovato nel nostro gruppo di pazienti con GPAA una ridotta connettività funzionale in una rete cerebrale principalmente per sostenere la memoria di lavoro, ma anche coinvolta nel controllo esecutivo *top-down* [43] e nell'elaborazione neurale delle informazioni visive. Infatti, tale rete cerebrale comprende principalmente le regioni fronto-parietali della "via visiva dorsale", che si occupa di informazioni spaziali ed orientamento al movimento [44]. È interessante notare che, lo stato di riposo alterato nella corteccia cingolata posteriore è stato trovato strettamente associato con la progressione della malattia di Alzheimer [45]. In generale, questa complessa rete cerebrale fa parte del cosiddetto "sistema di attenzione esterna" (EAS), che

media l'attenzione agli stimoli esogeni e la codifica impegnativa delle informazioni a breve termine in contrasto con la rete della modalità predefinita (DMN), la quale supporta i processi orientati internamente, tra cui il consolidamento costante e "off-line" della memoria [46]. In termini di dinamiche di rete cerebrale, è stato dimostrato che il EAS e la DMN sono funzionalmente anticorrelati e questo può spiegare nel nostro gruppo di pazienti con GPAA il ritrovamento di anomalie concomitanti e contrarie nella connettività funzionale. Infatti, sin dalla fase precoce del GPAA abbiamo osservato in varie parti del sistema di attenzione esterna una ridotta connettività funzionale che si è rivelata meno estesa in tutto il gruppo di pazienti, mentre la connettività funzionale della rete di modalità standard è stata inferiore nella fase iniziale del GPAA ma crescente in tutto il gruppo di pazienti, tutti cambiamenti che potrebbero rappresentare un tentativo fallito di riorganizzazione funzionale di compensazione e quindi un possibile "maladattamento" verso un peggioramento clinico. Un motivo simile potrebbe spiegare, nell'intero gruppo dei pazienti con GPAA, l'aumento della connettività funzionale all'interno della mappatura della rete subcorticale sul putamen, che al fianco della regolazione motoria esercita un ruolo in vari tipi di apprendimento [47]. Dall'altra parte, l'aumento della connettività funzionale nella stessa rete cerebrale che si verifica all'inizio del GPAA può essere visto come il tentativo di riorganizzazione funzionale adattativo in una fase iniziale della patologia cerebrale.

Correlazione tra i cambiamenti cerebrali esterni al sistema visivo e gli stadi della malattia e le misurazioni oftalmologiche

In termini di connettività anatomica, l'aumento della diffusività assiale è stata trovata durante le fasi della malattia lungo il fascicolo longitudinale superiore, che svolge un importante ruolo nella funzione visuo-spaziale, come accennato in precedenza. Inoltre, la progressiva riduzione del volume è stata mostrata nell'ippocampo, una struttura fondamentale per le funzioni della memoria, fino a raggiungere una condizione di atrofia nei pazienti con grave GPAA. Questi risultati indicano la presenza di alterazioni neurodegenerative progressive nelle strutture cerebrali impreviste, sostengono l'ipotesi del verificarsi di una patologia diffusa nel cervello dei pazienti con GPAA. Inoltre, i rapporti topografici del danno retinico, misurati mediante lo spessore delle RNFL, con cambiamenti nella connettività anatomica lungo i tratti della SB e con atrofia nelle regioni della MG lontane dal sistema visivo, possono essere secondari ai meccanismi di degenerazione transinaptica e diffusione della patologia nel cervello. Anomalie della connettività funzionale nelle reti cerebrali non visive, sebbene si verificano in pazienti con GPAA, non sono direttamente associate a misurazioni oftalmologiche nel presente studio e quindi la loro significatività rispetto ad altri risultati clinici (ad esempio, le prestazioni cognitive) dei pazienti con GPAA necessitano di essere esaminati negli studi futuri.

La relazione tra il GPAA e le malattie neurodegenerative

I risultati delle diffuse e progressive anomalie cerebrali osservate nel presente studio sin dallo stadio iniziale della malattia mostra come il GPAA sia una condizione complessa, che coinvolge le strutture e le funzioni impreviste del cervello. È importante sottolineare che abbiamo rilevato una progressiva diminuzione del volume dell'ippocampo attraverso le fasi GPAA, che ha raggiunto una condizione di atrofia nella fase grave. Come accennato in precedenza, questa regione del cervello sembra rappresentare il sito iniziale di accumulo di proteine malripiegate nella malattia di Alzheimer, con una successiva diffusione in tutto il cervello. È concepibile che un simile

meccanismo di diffusione transinaptica e *templating* della patologia, che è stata ipotizzata anche per le altre condizioni tipiche neurodegenerative (morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica) [14], si possa verificare nel cervello di una persona con GPAA. A sostegno di questa ipotesi, l'accumulo anomalo di aggregati proteici malripiegati (grovigli neurofibrillari e beta-amiloide) è stato riportato in strutture del sistema visivo nella malattia del glaucoma (sia sperimentale sia umano) e dell'Alzheimer [12]. Inoltre, altre caratteristiche condivise dal GPAA e dall'Alzheimer coinvolgono i meccanismi molecolari di stress ossidativo e metabolico, la perdita di specifiche popolazioni di neuroni, la presenza di reattività gliale [48] e un alto tasso di presenza di GPAA nei pazienti con Alzheimer [13]. Più recentemente, una nuova ipotesi connessa ad anomalie diffuse delle malattie di GPAA e Alzheimer è la possibile presenza in entrambe le condizioni di una disfunzione del sistema "glinfatico", un percorso paravascolare *brain-wide* che facilita la rimozione di soluti interstiziali dal cervello, tra cui il beta-amiloide [49].

Studiare i punti di forza ed i limiti

Diverse modalità di MRI sono state qui applicate per sondare *in the brain of study subjects* sia (micro e macro) l'integrità della struttura sia la connettività funzionale nelle reti degli stati di riposo. Abbiamo applicato un robusto e sensibile approccio di analisi, che permette di indagare le anomalie nell'intero cervello piuttosto che limitare l'analisi sulle regioni predefinite di interesse. Inoltre, questo approccio utilizza test non parametrici di permutazione, che si basa su ipotesi minime e può essere applicato quando l'approccio parametrico non è adeguato (ad esempio, gruppi di studio sbilanciati).

Per quanto riguarda il gruppo di pazienti, abbiamo reclutato un gruppo selezionato di pazienti con GPAA senza altri disturbi oftalmologici e neurologici, al fine di consentire una valutazione appropriata della diffusione neurodegenerativa. Il ruolo di possibili fattori contraddittori (età, sesso, presenza di ipertensione, iperintensità della SB) è stato controllato facendo corrispondere i due gruppi di studio ed utilizzandoli come covariate nei modelli statistici.

Una potenziale limitazione dello studio è l'uso di una sogliatura non corretta basata sui voxel. Infatti, le analisi in base ai voxel dell'intero cervello sono state effettuate con una soglia statistica "esplorativa" non corretta di $p < 0.005$ in quanto i risultati non sono sopravvissuti a correzioni più conservatrici per confronti multipli. Tuttavia, al fine di superare la questione dei falsi positivi, abbiamo selezionato cluster con una soglia di misura relativamente rigida di almeno 50 voxel vicini, simile all'approccio utilizzato da molti altri studi [11, 50]. Inoltre, seguendo un approccio utilizzato da altri studi [11, 51], un metodo Bonferroni completo per la correzione è stato utilizzato nelle analisi comparate effettuate sulle regioni di interesse dei cluster significativi derivati dalle statistiche non corrette in base ai voxel.

Conclusioni

I nostri risultati suggeriscono che i cambiamenti nella connettività anatomica e funzionale si verificano in tutto il cervello di pazienti con GPAA ben al di là del sistema visivo e sin dal primo stadio della malattia. Variazioni macroscopiche del volume possono verificarsi anche nel cervello di pazienti con GPAA, sebbene siano limitate alla fase grave della malattia. *The association of brain MRI changes* con le misurazioni classiche oftalmologiche dei danni alla retina e del campo visivo

sottolinea la rilevanza clinica dei risultati attuali ed evidenzia la necessità di strategie diverse e più complesse nella gestione dei pazienti con GPAA.

Finanziamenti

Lo studio è stato finanziato da una sovvenzione per l'educazione senza restrizione da parte dell'Istituto per la Ricerca, la Formazione e la Riabilitazione (I. Ri. Fo. R. onlus)

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Riccardo Tappa Brocci (Università di Siena) per l'aiuto con l'acquisizione dei dati della MRI