



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN**

**PROYECTO FIN DE CARRERA
INGENIERO DE TELECOMUNICACIÓN**

**DESARROLLO Y COMPARACIÓN DE
PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS
DE RESONANCIA DE DIFUSIÓN
PARA ESTUDIO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

AUTOR: Ana Victoria Gutiérrez Sánchez

TUTOR: Rodrigo de Luis García

Octubre de 2014

TÍTULO: Desarrollo y comparación de procedimientos de análisis de resonancia de difusión para estudio de la enfermedad de Alzheimer

AUTOR: Ana Victoria Gutiérrez Sánchez

TUTOR: Rodrigo de Luis García

DEPARTAMENTO: Teoría de la Señal, Comunicaciones e Ingeniería Telemática

Miembros del Tribunal:

PRESIDENTE: Carlos Alberola López

SECRETARIO: Rodrigo de Luis García

VOCAL: Santiago Aja Fernández

SUPLENTE: Federico Simmross Wattenberg

FECHA DE LECTURA: 14 de Octubre de 2014

CALIFICACIÓN:

Resumen del proyecto

Una herramienta no invasiva muy útil y ampliamente utilizada en el estudio *in vivo* de enfermedades neurológicas y cerebrales es DTI (*Diffusion Tensor Imaging*), que es una de las variantes más comunes de la resonancia magnética de difusión. Se trata de una modalidad de resonancia magnética basada en la medición de la difusión de las moléculas de agua en los tejidos. En la materia blanca esta difusión viene determinada por la orientación de los axones que constituyen las fibras nerviosas. A partir de la información proporcionada por DTI pueden obtenerse diferentes medidas de la difusión así como realizarse una reconstrucción de las fibras que componen la materia blanca.

En este proyecto se pretenden analizar las alteraciones de conectividad en la sustancia blanca en pacientes con Alzheimer, comparando además el funcionamiento de varias técnicas de análisis de DTI. Existen diversas maneras de realizar este análisis. En este proyecto se emplean y comparan tres de ellas: VBM, TBSS y conectómica. Las dos primeras se basan en la comparación voxel a voxel de varios volúmenes registrados sobre un mismo espacio, mientras que la tercera consiste en la reconstrucción de los haces de fibras que conectan distintas regiones del cerebro y el análisis de la matriz de conectividad resultante.

El estudio se realiza sobre datos tanto de controles sanos como de pacientes con distintos grados de enfermedad de Alzheimer, con el fin de encontrar diferencias entre unos y otros que permitan caracterizar esta enfermedad.

Como resultado de este estudio se han encontrado diferencias en distintas medidas de la difusión entre controles sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer leve y moderada así como entre pacientes con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer leve. Mientras que los procesos de VBM y TBSS presentan resultados bastante similares, el análisis de conectómica proporciona resultados de distintas características y más localizados.

Palabras clave: DTI, difusión, Alzheimer, VBM, TBSS, conectómica

Abstract

Diffusion Tensor Imaging (DTI) is one of the most common techniques employed in diffusion magnetic resonance imaging, a noninvasive tool widely used to study neurological and brain diseases *in vivo*. This type of magnetic resonance imaging is based on the measuring of diffusion of water molecules within the tissues. In the white matter of the brain, diffusion is aligned to the orientation of the axons that compose nerve fibers. From the information provided by DTI, different diffusion measures can be obtained, as well as the reconstruction of the fibers' trajectories using tractography.

The goal of this project is to analyse the alterations in white matter connectivity in patients with Alzheimer's disease, and to compare the performance of several white matter analysis techniques. Three of these techniques are employed and compared: VBM, TBSS and connectomics. The first two are based on voxelwise comparison among a set of volumes that are registered to the same space, while the third consists of the reconstruction of the bundles connecting different regions in the brain cortex and the analysis of the resulting connectivity matrix.

The study was performed using data from healthy controls and patients with different degrees of Alzheimer's disease, in order to find differences between them that can help characterize the pathology.

As a result, differences were found between healthy controls and patients with mild and moderate Alzheimer's disease and also between patients with mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease using several scalar measures derived from DTI. While VBM and TBSS provide fairly similar results, the use of connectomics produces results with different localization features.

Keywords: DTI, Diffusion, Alzheimer, VBM, TBSS, connectomics

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado en la realización de este Proyecto Fin de Carrera y a lo largo de los cinco años de carrera que lo precedieron.

En primer lugar a mis padres, por su apoyo y su paciencia, que han tenido que aguantarme en los momentos de mayor estrés. También al resto de mi familia, en especial a mis primos, por haber estado siempre ahí.

A mi tutor, Rodrigo, por su ayuda y guía a lo largo de los últimos meses. Y al resto de profesores que a lo largo de la carrera me han enseñado lo suficiente para llegar hoy aquí.

A todos mis amigos y amigas de Teleco, de la resi y también de Ávila, por su compañía y por su fe en mí, que muchas veces ha sido lo que me ha ayudado a seguir adelante. También a mis compañeros de clase, porque de una forma u otra han hecho que tratara de mejorar y superarme tanto en lo académico como en lo personal.

A todos ellos, gracias por todo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Objetivos	3
1.3. Fases	3
1.4. Medios	4
1.4.1. Datos de partida	4
1.4.2. Software	5
1.5. Estructura del documento	7
2. Diffusion Tensor Imaging (DTI)	9
2.1. Resonancia de difusión	9
2.1.1. Principio físico	9
2.1.2. Diffusion Weighted Imaging (DWI)	10
2.1.3. Qué es DTI	12
2.2. Procesado de DTI	12
2.2.1. Tensores	12
2.2.2. Medidas escalares	14
2.2.3. Tractografía	16
2.3. Análisis de la materia blanca con DTI	17
2.3.1. Voxel-Based Morphometry (VBM)	17
2.3.2. Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)	18
2.3.3. Conectómica	20
3. Análisis de DTI con TBSS	23
3.1. Proceso	23
3.2. Preparación de los datos	24
3.3. Análisis TBSS	26
3.4. Resultados	28

4. Análisis de DTI con VBM	37
4.1. VBM empleando TBSS	37
4.2. Proceso	38
4.3. Análisis VBM	39
4.4. Resultados	40
5. Análisis de DTI mediante conectómica	57
5.1. Proceso	57
5.2. Segmentación y parcelación	58
5.3. Tractografía	59
5.3.1. Tractografía global	59
5.3.2. Tractografía entre regiones	63
5.4. Matrices de conectividad	63
5.4.1. Medidas de conectividad	63
5.4.2. Parámetros de conectividad	65
5.5. Análisis estadístico	68
5.6. Resultados	70
6. Comparación de los procedimientos de análisis empleados y sus resultados	73
7. Conclusiones y líneas de trabajo futuro	81
7.1. Conclusiones	81
7.2. Líneas futuras	83
Índice de figuras	86
Índice de cuadros	87
Referencias	93
A. Scripts	95
A.1. Script 1: preparar_datos_tbss	96
A.1.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script	96
A.1.2. Pasos realizados automáticamente por el script	96
A.2. Script 2: tbss	98
A.2.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script	98
A.2.2. Pasos realizados automáticamente por el script	99
A.2.3. Ejemplo de archivo design.mat	101

A.2.4.	Ejemplo de archivo design.con	101
A.3.	Script 3: vbm	102
A.3.1.	Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script	102
A.3.2.	Pasos realizados automáticamente por el script	103
A.4.	Script 4: conectomica	105
A.4.1.	Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script	105
A.4.2.	Pasos realizados automáticamente por el script	105
A.4.3.	Script de Matlab: matrices de conectividad	107
A.4.4.	Script de Matlab: análisis estadístico	108

B. Etiquetas de la parcelación **109**

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

Hoy en día, la tecnología y la medicina están fuertemente ligadas. La primera es empleada con frecuencia por los especialistas de la segunda para el almacenamiento y administración de los datos de los pacientes, como herramienta fundamental en las operaciones quirúrgicas y tratamientos médicos, así como para el diagnóstico y la investigación de las distintas patologías.

Una herramienta de diagnóstico no invasiva ampliamente utilizada es la resonancia magnética [41], que utiliza campos magnéticos para obtener información sobre la estructura y la composición de distintas partes del cuerpo humano. Mediante la resonancia magnética se observan los núcleos de hidrógeno (protones) de las moléculas que forman el cuerpo humano, que tienen propiedades características en función de sus entornos físicos y químicos. En una resonancia magnética, se excitan estos protones usando un fuerte campo magnético, de manera que se alinean con el mismo. A continuación, se desestabilizan los núcleos mediante señales de radiofrecuencia. Cuando esta señal desaparece, los núcleos vuelven a su posición de alineamiento, devolviendo la energía adquirida mediante nuevas señales de radiofrecuencia, que son medidas por una antena. Cada tipo de tejido responde de manera distinta a la excitación, por lo que la señal emitida es también diferente. Mediante el uso de esta herramienta se obtienen imágenes que pueden ser tratadas y analizadas por sistemas informáticos.

DTI (*Diffusion Tensor Imaging*) [21, 22] es una modalidad de resonancia magnética que se basa en la medición de la difusión de las moléculas de agua *in vivo* en los tejidos. Puesto que dicha difusión varía en función del tipo de

tejido y sus características, su medición permite determinar la estructura de los mismos.

DTI asume un modelo gaussiano para la difusión, proporcionando para cada voxel un tensor de segundo orden que se corresponde con una matriz simétrica 3x3 [50]. Estos tensores representan la difusión de las moléculas de agua en cada voxel y proporcionan información sobre la dirección en que ésta es mayor. A partir de los tensores se pueden calcular otras medidas de la difusión que permiten obtener distinta información. Estas nuevas medidas, al ser magnitudes escalares en lugar de matrices, resultan más fáciles de comparar. Las principales son la anisotropía fraccional (FA, *Fractional Anisotropy*), que indica la fracción de la difusión que es anisótropa, y la difusividad media (MD, *Mean Diffusivity*), que es la media de los autovalores del tensor e indica la cantidad total de difusión. Aunque menos empleadas, también se utilizan otras medidas escalares como el modo (*Mode*), la traza (*Trace*), la medida lineal (LM, *Linear Measure*), la difusividad radial (RD, *Radial Diffusivity*) y la difusividad axial (AD, *Axial Diffusivity*).

Usando la resonancia magnética convencional se pueden identificar fácilmente los centros funcionales del cerebro, pero no ocurre lo mismo con la compleja disposición de las fibras de la materia blanca, que aparece como homogénea. Sin embargo, puesto que en la materia blanca la difusión no es igual en todas direcciones, sino que depende de la orientación de los axones, DTI permite el estudio *in vivo* de su estructura anatómica, facilitando la obtención de medidas no invasivas de las conexiones cerebrales.

Para el estudio de múltiples patologías cerebrales, DTI resulta ser una herramienta sumamente útil. A partir de las imágenes de DTI de varios sujetos pueden realizarse comparaciones entre personas sanas y otras con distintas enfermedades cerebrales. Para realizar esos análisis, existen distintos procedimientos.

Una posible manera consiste en alinear todos los casos sobre un mismo espacio, lo que se conoce como registrado, para posteriormente comparar voxel a voxel las diferentes medidas entre los distintos sujetos del estudio. Esta comparación se puede realizar sobre todo el volumen ocupado por la materia blanca [52] o solo en ciertas regiones, como aquellas en las que la FA toma valores mayores, el esqueleto de FA [47].

Otra forma de análisis de DTI se basa en la estimación de las trayectorias de las conexiones en la materia blanca dando lugar a lo que se conoce

como tractografía [50]. Realizando una segmentación de la corteza cerebral en distintas regiones de manera conjunta con la tractografía puede realizarse un estudio de la conectómica [34, 40], es decir, determinar medidas sobre la conectividad entre las distintas áreas del cerebro.

Existiendo estos y más procedimientos de análisis de DTI para estudios de distintos grupos resulta interesante saber cuál de ellos permite encontrar mayores diferencias. En este proyecto se comparan los tres descritos anteriormente con el fin de comprobar si proporcionan resultados similares, o si, por el contrario, éstos difieren bastante.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto consiste en realizar un estudio, mediante análisis de DTI, de la enfermedad de Alzheimer. Se dispone de las imágenes de resonancia magnética de distintos sujetos, clasificados en cinco grupos en función del grado de enfermedad de cada uno. El propósito de dicho análisis es estudiar si existen diferencias entre los controles sanos y los distintos grupos de enfermos.

Asimismo, se pretenden comparar distintas técnicas de análisis: VBM (Voxel-Based Morphometric) [52], TBSS (Tract-Based Spatial Statistics) [47] y análisis de conectividad o conectómica [34, 40]. Para ello se realizan los distintos procesos partiendo de los mismos datos para después contrastar los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

Un objetivo adicional es proporcionar una guía de cada método de procesado de DTI, bien descrita y documentada, de manera que pueda usarse fácilmente en futuros análisis.

1.3. Fases

El proyecto se puede dividir en distintas fases. En primer lugar, un estudio de las nociones básicas de DTI seguido de otro sobre los distintos procedimientos de análisis empleados, así como de las herramientas *software* necesarias para llevarlos a cabo.

La siguiente fase trata de la preparación de los datos de partida para los posteriores análisis. Esta preparación consta de la obtención de los tensores, el cálculo de los parámetros escalares necesarios en el formato adecuado y la reorientación de las imágenes de acuerdo al estándar empleado por los programas a utilizar.

Una cuarta fase consiste en realizar el análisis conjunto de los datos con cada uno de los métodos. Por un lado, procesar las medidas de difusión mediante el análisis con VBM y TBSS. Por otro lado, obtener la segmentación cortical de cada sujeto y la tractografía, para poder realizar el consiguiente análisis de conectividad. A continuación, realizar el estudio estadístico de los resultados obtenidos con cada procedimiento para extraer las diferencias entre los distintos grupos de sujetos.

Finalmente, en la última fase se contrastan los distintos métodos de análisis empleados y los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

1.4. Medios

1.4.1. Datos de partida

Para la realización del estudio se dispone de los volúmenes de resonancia magnética de 73 sujetos. Dichos datos fueron adquiridos por una unidad GE Signa 1,5T MRI en QDiagnóstica, Valladolid, España. Los parámetros del protocolo de adquisición son: 25 direcciones de gradiente, un volumen base, $b = 1000s/mm^2$, tamaño de voxel de $1,015 \times 1,015 \times 3mm$, $TR = 13000ms$, $TE = 85,5ms$, matriz 128×128 , $NEX = 2$ (se hacen dos adquisiciones que se promedian para mejorar la relación señal a ruido) y 39 cortes que cubren todo el cerebro.

Para cada volumen se tienen los siguientes datos:

- DWIs originales, en formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*), que es el formato estándar internacional para las imágenes médicas y la información relacionada [5].
- Las imágenes T1, en formato DICOM.
- Los tensores previamente calculados usando el método de estimación de mínimos cuadrados, en formato NRRD, formado por dos ficheros

distintos: `.nhdr` con la información de cabecera y `.raw` con los datos [4].

Los distintos sujetos están agrupados en 5 grupos diferentes según sean controles sanos o pacientes con distintos grados de enfermedad de Alzheimer. Para algunos de los análisis realizados se utilizan solo los tres primeros grupos, en lugar de los cinco, debido a que el número de sujetos de los dos últimos es muy escaso. Para diferenciar unos grupos de otros los archivos correspondientes a cada paciente se han renombrado de manera que queden ordenados alfabéticamente según el grupo al que pertenecen, añadiendo al principio del nombre del archivo una letra que designa al grupo. El total de sujetos en cada grupo, así como la letra que los identifica, aparecen reflejados en el cuadro 1.1.

Grupo	Número de sujetos	Letra
Control sano	25	A
Deterioro cognitivo leve	12	B
Enfermedad de Alzheimer leve	28	C
Enfermedad de Alzheimer moderada	7	D
Enfermedad de Alzheimer avanzada	1	E

Cuadro 1.1: Grupos de pacientes

1.4.2. Software

El estudio completo se realiza, de manera remota, sobre dos servidores que trabajan con sistema operativo *Scientific Linux 6.5*. Uno de ellos con 2 procesadores de 4 núcleos *Intel Xeon X5355* y 16 GB, y el otro con 4 procesadores de 4 núcleos *AMD Opteron 8350* y 32 GB.

Además de las herramientas propias del sistema para el manejo de ficheros y directorios, así como para la creación de los *scripts* empleados, se utilizan distintos *softwares* especializados en el análisis de imágenes de resonancia magnética y herramientas matemáticas.

3D Slicer

3D Slicer [1, 31], desarrollado como una colaboración entre el *Surgical Planning Laboratory* del *Brigham and Women's Hospital* y el *Artificial Intelligence Laboratory* del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), es un paquete de *software* libre, de código abierto, para el análisis y la visualización de imágenes médicas. Slicer proporciona, entre otras, una gran variedad de herramientas para el estudio de imágenes de resonancia magnética y de difusión, además de un entorno gráfico para la representación de los volúmenes.

En el estudio realizado, Slicer supone una herramienta fundamental para el preprocesado de los datos y el análisis de conectividad. Más concretamente, se emplea para:

- La obtención de las medidas escalares (FA, LM, Mode, Trace, RD y AD) a partir de los tensores.
- La conversión de los ficheros obtenidos en el paso anterior en formato .ndhr a formato .nii.
- El cálculo de la tractografía global de cada sujeto a partir de los DWI.
- La obtención de las tractografías entre las distintas regiones obtenidas con la segmentación a partir de la tractografía global.

FSL

FSL (*FMRIB Software Library*) [9, 38], creado principalmente por el Grupo de Análisis FMRIB (*Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain*) de la Universidad de Oxford, es una biblioteca de herramientas para el análisis de imágenes cerebrales de resonancia magnética y de difusión. Además, proporciona un entorno gráfico para la visualización de los datos, *fslview*, y otras funcionalidades como *randomise*, que es un método de permutación para el modelado de mapas estadísticos.

FSL es el *software* principal empleado para:

- El procesado mediante TBSS. Realiza el registrado de todos los volúmenes sobre un mismo atlas y establece el esqueleto de FA media.
- El procesado mediante VBM a partir del anterior. Utilizando una máscara de FA diferente a la usada en TBSS se puede abarcar un volumen mayor de materia blanca.

- El análisis estadístico de los resultados obtenidos por ambos métodos.

FreeSurfer

FreeSurfer [8], desarrollado en el *Martinos Center for Biomedical Imaging* por el *Laboratory for Computational Neuroimaging*, es un conjunto de herramientas para el estudio de la anatomía cortical y subcortical y la visualización de imágenes cerebrales. Entre otras, incluye la segmentación del cerebro [32], la reconstrucción de las superficies corticales entre la materia blanca y la gris [28, 29] así como la parcelación y etiquetado de las regiones corticales y subcorticales [33]. También dispone de distintos entornos gráficos para la representación de los volúmenes y las superficies.

FreeSurfer es utilizado en el análisis de conectividad para obtener la segmentación y parcelación de las regiones corticales necesarias para el posterior estudio.

Matlab

Matlab [12], desarrollado por MathWorks, consiste en un lenguaje de alto nivel y un entorno interactivo para el cálculo numérico, la visualización y la programación. Permite analizar datos, trabajar con matrices, desarrollar algoritmos y crear aplicaciones.

En el análisis de conectividad, Matlab es utilizado para:

- El procesado de los datos obtenidos de las tractografías.
- La creación de matrices de conectividad con distinta información de las conexiones entre las diferentes regiones y su representación gráfica.
- El cálculo de distintos parámetros de conectividad a partir de las matrices anteriores.
- El análisis estadístico de los valores obtenidos.

1.5. Estructura del documento

En la presente memoria se recogen y detallan los pasos seguidos a lo largo de este análisis. En el capítulo 2 se explican los fundamentos de la resonancia

de difusión (2.1), el principio físico en el que se basa (2.1.1), cómo se obtiene (2.1.2) y en qué consiste DTI (2.1.3), los procedimientos para el procesado de las imágenes de difusión (2.2), qué son los tensores de difusión (2.2.1), las medidas escalares obtenidas a partir de ellos (2.2.2) y la tractografía (2.2.3), así como los tres tipos de análisis de la materia blanca llevados a cabo (2.3).

Los capítulos 3, 4 y 5 corresponden a los distintos análisis realizados. En ellos se explica el proceso seguido para cada procedimiento y los resultados obtenidos con cada uno de ellos. El capítulo 6 consiste en la comparación de los tres métodos de análisis empleados. Finalmente, en el capítulo 7 se recogen las conclusiones de todo el trabajo realizado y las líneas de trabajo futuro propuestas.

Por último, en el apéndice A se muestra una guía de uso de los *scripts* empleados para realizar el análisis completo (A.1, A.2, A.3 y A.4) mientras que el apéndice B contiene una lista con las etiquetas utilizadas en la segmentación y parcelación del análisis de conectómica.

Capítulo 2

Diffusion Tensor Imaging (DTI)

2.1. Resonancia de difusión

2.1.1. Principio físico

La difusión es el proceso físico mediante el cual las partículas de materia se mueven de manera aleatoria de un lugar a otro dentro de un medio debido a movimientos térmicos moleculares, denominados movimientos brownianos [26]. Estos movimientos vienen descritos por la ley de Fick (2.1) de 1855, según la cual, cuando existen diferencias locales de soluto en una concentración se origina un flujo irreversible de las moléculas del soluto desde las zonas de mayor concentración a las de menor.

$$J = D \cdot \nabla c \quad (2.1)$$

En la ecuación 2.1 J es el flujo producido por la difusión que atraviesa una superficie, D [$\frac{mm^2}{s}$] es el coeficiente de difusión que representa la facilidad con que el soluto se mueve en el medio disolvente y ∇c es el gradiente de concentración.

Einstein demostró que el coeficiente de difusión es proporcional al cuadrado medio de la distancia recorrida por las partículas ($\langle \Delta r^2 \rangle$) dividido entre el tiempo transcurrido (Δt) y el número de dimensiones del medio en el que se produce la difusión (n):

$$D = \frac{\langle \Delta r^2 \rangle}{2n\Delta t} \quad (2.2)$$

En un medio tridimensional ($n = 3$), la ecuación (2.2) queda de la forma:

$$D = \frac{\langle \Delta r^2 \rangle}{6\Delta t} \quad (2.3)$$

Cuando las moléculas no tienen restricciones, la dirección del movimiento es aleatoria y los desplazamientos de las moléculas a lo largo del tiempo son descritos por una distribución gaussiana univariante. En este caso, se trata de difusión isotrópica, y la desviación típica es la misma en todas las direcciones. Por el contrario, cuando la movilidad de las moléculas depende de la orientación del medio se trata de difusión anisotrópica. En microestructuras como las fibras de la materia blanca el movimiento de las moléculas se ve limitado en ciertas direcciones.

En un medio anisotrópico se necesita mayor información para describir el desplazamiento tridimensional de las partículas que en un medio isotrópico. Así, mientras que para la difusión isotrópica es suficiente con un parámetro D , para describir la difusión anisotrópica son necesarios más parámetros independientes, seis si se describe la difusión como una distribución gaussiana multivariante.

2.1.2. Diffusion Weighted Imaging (DWI)

La resonancia de difusión es una variante de la resonancia magnética que aporta información complementaria a las imágenes de resonancia magnética convencionales. Se basa en la detección del movimiento browniano de las moléculas de agua en los tejidos [44].

Dependiendo de la parte del cuerpo humano que se estudie, se puede buscar difusión isotrópica o anisotrópica. En la materia blanca del cerebro, puesto que la movilidad de las moléculas de agua está restringida por los axones, orientados a lo largo de las fibras, se trata de difusión anisotrópica, que será mayor en la dirección de las fibras.

Para medir la difusión se utilizan gradientes de campo magnético para crear imágenes sensibilizadas a la difusión en una determinada dirección, denominadas DWI (*Diffusion Weighted Imaging*). Se emplea la secuencia de

imagen de Stejskal y Tanner [49] que aplica un par de pulsos de gradiente bipolares después de la excitación y antes de la adquisición de los datos, de manera que se sensibiliza la imagen a la difusión de los protones de las moléculas de agua. El primero de los gradientes produce un cambio de la fase de magneticación. El segundo, invierte el cambio de fase, de manera que para las moléculas estacionarias, ambos desfases se cancelan mutuamente. Sin embargo, aquellas moléculas que se han desplazado debido a movimientos brownianos durante el periodo de tiempo entre ambos pulsos experimentan una diferencia de fase aleatoria. Debido a esta diferencia de fase, la señal de eco de las moléculas que se difunden se atenúa. Por ello, en estas imágenes las zonas con una difusión paralela al gradiente se muestran oscurecidas. A partir de las imágenes DWI, es posible calcular, mediante la ecuación 2.4, un parámetro escalar de difusión, el coeficiente de difusión aparente o ADC (*Apparent Diffusion Coefficient*) [43], que depende de la dirección del gradiente empleado.

$$S = S_0 e^{-bD} \quad (2.4)$$

En esta ecuación, S es la intensidad medida tras aplicar el gradiente de difusión, S_0 es la intensidad de la señal en ausencia del mismo y b es el factor de ponderación de difusión de LeBihan [42], que describe la secuencia de pulsos, la intensidad del gradiente y las constantes físicas. Para pulsos de gradiente rectangulares, el factor b viene descrito por la ecuación 2.5.

$$b = \gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) |g|^2 \quad (2.5)$$

Donde γ es el relación giromagnética del protón (42 MHz/Tesla), $|g|$ es la fuerza de los pulsos de gradiente, δ es la duración de los pulsos, y Δ es el tiempo entre los pulsos.

En tejidos fibrosos, la difusión del agua depende del ángulo entre el eje de la fibra y el gradiente de campo magnético aplicado. Cuando el gradiente es paralelo a la fibra, la difusión medida será mayor que cuando es perpendicular. Dependiendo de la orientación relativa de los gradientes de difusión y de las fibras en la materia blanca, se pueden medir distintos valores de ADC, pues el valor de ADC obtenido solo mostrará la difusión en la dirección del gradiente aplicado. Para obtener una medida de la difusión que indique también la dirección de la misma se emplean múltiples gradientes, que permiten

calcular un coeficiente de difusión no escalar, el tensor de difusión (\mathbf{D}) [21].

2.1.3. Qué es DTI

DTI es una modalidad de resonancia magnética de difusión que describe la difusión del agua mediante un modelo gaussiano. Permite calcular a partir de la medida de la difusión en distintas direcciones, para cada voxel del volumen, un tensor de segundo orden. Además, mediante esta técnica se pueden reconstruir, de manera no invasiva, las trayectorias de las fibras de los tejidos.

La magnitud medida en DTI es la difusividad o coeficiente de difusión, es decir, el parámetro D de la ecuación 2.1. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del tejido causada por las membranas de mielina de los axones y las membranas celulares, las moléculas de agua se difunden a lo largo de las fibras y la difusión varía, por tanto, con la dirección. Es por ello que no sirve con un único parámetro escalar para describir la difusión, sino que se necesita un tensor que describa la movilidad de las moléculas a lo largo de cada dirección y la correlación entre estas direcciones.

Para calcular el tensor de difusión, deben obtenerse imágenes de difusión sensibilizadas con distintas direcciones de gradiente. Para definir el vector se necesitan, al menos, seis imágenes sensibilizadas con distintos gradientes, así como una imagen no sensibilizada a la difusión.

2.2. Procesado de DTI

2.2.1. Tensores

Para caracterizar la difusión gaussiana en medios anisótropos, donde los desplazamientos de las moléculas no son iguales en todas direcciones, se emplean los tensores de difusión. Un tensor de difusión \mathbf{D} (2.6) es una matriz 3x3 simétrica y definida positiva. Por esas características, tiene tres autovectores ortogonales y otros tres autovalores positivos. El mayor autovector indica la dirección principal de difusión. En los tejidos fibrosos anisótropos también indica el eje de la fibra. Los tres autovalores (λ_1 , λ_2 y λ_3 , siendo

$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3$,) indican la difusividad en la dirección de cada autovector [22].

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

Donde $D_{ij} = D_{ji}$ para $j \neq i$.

Para el cálculo de los tensores debe resolverse la ecuación de Stejskal-Tanner para el caso anisótropo (2.7) que describe cómo la intensidad de la señal en cada voxel disminuye en presencia de difusión gaussiana [49]:

$$S_k = S_0 e^{-b \hat{\mathbf{g}}_k^T \mathbf{D} \hat{\mathbf{g}}_k} \quad (2.7)$$

En esta ecuación, S_0 es la intensidad de la señal en ausencia de un gradiente de difusión. S_k es la intensidad medida tras aplicar el k -ésimo gradiente de difusión en la dirección $\hat{\mathbf{g}}_k$. $\hat{\mathbf{g}}_k^T \mathbf{D} \hat{\mathbf{g}}_k$ representa el coeficiente de difusión en la dirección $\hat{\mathbf{g}}_k$. Y b es el factor de ponderación de difusión de LeBihan, relacionado con la intensidad del gradiente aplicado (ecuación 2.5).

Puesto que el tensor de difusión \mathbf{D} es una matriz 3x3 simétrica, tiene seis grados de libertad. Por tanto, para estimar el tensor deben realizarse, al menos, siete medidas diferentes, seis tomadas con diferentes direcciones de gradiente, ortogonales entre sí, y otra en ausencia de gradiente. Sin embargo, dado que las medidas obtenidas son bastante ruidosas, suele utilizarse un número bastante mayor de gradientes para conseguir una estimación más robusta. Resolviendo el sistema de ecuaciones resultante para cada voxel se obtienen los vectores de difusión correspondientes. Dicho sistema se puede resolver de distintas maneras. Aunque la más habitual es mediante mínimos cuadrados, también se utilizan otras más complejas como mínimos cuadrados ponderados o métodos variacionales, que resuelven ecuaciones de manera iterativa.

La difusión anisótropa puede describirse mediante elipsoides en los que los radios representan la difusión en cada dirección [20]. Los ejes principales de estos elipsoides corresponden con las direcciones del sistema de autovectores de los tensores. Cuanto menos se parezca la forma del elipsoide a una esfera, mayor será la anisotropía. El eje principal del elipsoide corresponde con la dirección de mayor difusión e indica la orientación del eje de la fibra. Hay

distintos factores que afectan a la forma de los elipsoides de difusión, entre ellos la densidad de las fibras, el grado de mielinización, el diámetro medio de las fibras y la similitud de las direcciones de las fibras dentro de un voxel [50].

2.2.2. Medidas escalares

A partir de los tensores pueden calcularse diferentes medidas escalares, que proporcionan distinta información sobre la difusión o la anisotropía. Estas medidas resultan más sencillas de comparar, puesto que, al contrario que los tensores, no son matrices. Además, su visualización es menos compleja.

Las principales medidas que se pueden obtener a partir de los tensores de difusión son las siguientes:

Difusividad media (MD, *Mean Diffusivity*)

Es el valor medio de los autovalores del tensor y representa la cantidad de difusión en cada voxel [24].

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} = \frac{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}{3} \quad (2.8)$$

Traza (*Trace*)

Es una medida equivalente a la MD. Se calcula como la suma de los elementos diagonales del tensor, lo que equivale a la suma de los autovalores [20].

$$trace = D_{xx} + D_{yy} + D_{zz} = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 \quad (2.9)$$

Anisotropía fraccional (FA, *Fractional Anisotropy*)

Mide la fracción de difusión que es anisótropa, es decir, la diferencia entre el elipsoide que es el tensor y una esfera. Varía entre los valores 0 y 1, y puede obtenerse sin necesidad de calcular explícitamente los autovalores [24].

$$\begin{aligned}
FA &= \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2}}{(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)} \\
&= \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{2}} \frac{|\mathbf{D} - \frac{1}{3}\text{trace}(\mathbf{D})\mathbf{I}|}{|\mathbf{D}|}
\end{aligned} \tag{2.10}$$

Donde \mathbf{I} es el tensor identidad.

Modo (*Mode*)

Mide la diferencia entre la anisotropía planar y lineal. Es una medida ortogonal a la FA y está referida a la asimetría de los autovalores. Varía entre los valores -1 y 1 [30].

$$mode = \frac{(-\lambda_1 - \lambda_2 + 2\lambda_3)(2\lambda_1 - \lambda_2 - \lambda_3)(-\lambda_1 + 2\lambda_2 - \lambda_3)}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - \lambda_1\lambda_2 - \lambda_1\lambda_3 - \lambda_2\lambda_3)^{3/2}} \tag{2.11}$$

Medida lineal (LM, *Linear Measure*)

Refleja la uniformidad de la dirección de las fibras dentro de un voxel, es decir, describe cómo de cerca está el tensor de ser una línea. Varía entre los valores 0 y 1 [50].

$$LM = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1} \tag{2.12}$$

Difusividad axial (AD, *Axial Difusivity*)

La difusividad axial, también llamada difusividad paralela, es igual al mayor de los autovalores. Representa la difusividad paralela a las fibras [46].

$$AD = \lambda_1 \tag{2.13}$$

Difusividad radial (RD, *Radial Difusivity*)

La difusividad radial, también llamada difusividad perpendicular, es igual a la media de los dos autovalores menores. Representa la difusividad perpendicular a las fibras [46].

$$RD = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2} \quad (2.14)$$

A veces, la difusividad radial y la difusividad axial pueden estar normalizadas entre el valor de la traza o entre $\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}$ para que su valor varíe entre 0 y 1.

2.2.3. Tractografía

DTI permite obtener una representación de las trayectorias de las fibras cerebrales *in vivo*, mediante el proceso de la tractografía [50]. DTI no proporciona directamente información sobre cómo se conectan las fibras entre voxels vecinos, sino que debe deducirse utilizando algoritmos de tractografía, que generan estimaciones de las trayectorias de las fibras en la materia blanca.

La difusión anisótropa en la materia blanca se debe a la organización de la misma en haces de fibras. La difusión en la dirección de las fibras es mayor que en direcciones ortogonales a las mismas. Esta característica puede ser utilizada para representar la orientación de las fibras a partir de las imágenes de DTI basándose en que el autovector principal está alineado con la dirección de la fibra. Puesto que el tamaño de las fibras es mucho menor que el de los voxels empleados, lo que se obtiene en realidad son aproximaciones de conjuntos de fibras.

Existen múltiples algoritmos para obtener la tractografía [23, 45, 39], pero en general pueden clasificarse en dos tipos: tractografía determinista, que asume una orientación única en cada voxel y da una estimación de los parámetros del modelo, eligiendo la trayectoria más probable; y tractografía probabilística, que asume una distribución de orientaciones y proporciona la distribución de probabilidad de la estimación, tratando de describir todas las posibles trayectorias de la fibra. La tractografía determinista se basa en la suposición de que el principal autovector es paralelo a la fibra dominante en el voxel. Las fibras son estimadas mediante la propagación en una dirección

a partir de un punto origen. En la tractografía probabilística la propagación desde el punto de origen se lleva a cabo en varias direcciones, resultando un conjunto de múltiples fibras que pasan por el punto origen. El resultado final es un conjunto de fibras probables, que no necesariamente tienen que existir.

Normalmente se emplean al menos dos umbrales distintos para limitar la tractografía. El primero de ellos es un valor mínimo de FA, de manera que la fibra termina si entra en una región que no supere ese umbral. El segundo es el ángulo máximo que puede girar una fibra entre un paso y el siguiente. También suelen utilizarse otros como la longitud mínima y la longitud máxima de las fibras calculadas.

2.3. Análisis de la materia blanca con DTI

DTI permite estudiar *in vivo* y de manera no invasiva la materia blanca del cerebro. La medida de la difusión y los distintos parámetros que la representan, así como la reconstrucción de las fibras que la componen, permite analizar su estructura. Realizar un estudio sobre su configuración y sus características puede ser muy útil tanto para entender el funcionamiento del cerebro, como para diagnosticar e investigar distintas patologías.

Una aplicación frecuente del análisis de la materia blanca con DTI es la realización de estudio grupales, en los que se comparan distintos grupos de datos de DTI. Así se puede contrastar un grupo de personas con unas características (por ejemplo, controles sanos de cierta edad) con otro u otros distintos (por ejemplo, personas con una cierta patología y de edad similar a los controles).

Existen múltiples formas de llevar a cabo estos análisis de la materia blanca. Tres de ellas son las empleadas en este estudio y se describen a continuación.

2.3.1. Voxel-Based Morphometry (VBM)

VBM [52] es una técnica para caracterizar diferencias regionales de volumen y concentración de tejido cerebral a partir de imágenes de resonancia magnética. Permite la comparación voxel a voxel de imágenes espacialmente normalizadas de dos grupos de sujetos. La idea base de esta técnica consiste

en la normalización espacial de todos los sujetos en un mismo espacio. El resultado de llevar a cabo este procedimiento es un mapa estadístico que muestra las regiones que presentan diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Todo el proceso consta de distintas fases [19, 35]:

- Creación del atlas (opcional): Para realizar la normalización espacial deben registrarse todos los volúmenes sobre un mismo atlas. Este atlas puede crearse a partir de los volúmenes que se van a estudiar o, por el contrario, puede utilizarse uno ya existente.
- Normalización espacial: Todos los volúmenes se transforman registrando las imágenes en un mismo atlas común. Para ello se llevan a cabo transformaciones tanto lineales como no lineales de los volúmenes.
- Segmentación: Los volúmenes normalizados son segmentados, separando la materia gris de la blanca y de otras regiones no cerebrales. Para ello se combina un conocimiento previo de la distribución normal de los tejidos en el cerebro con un estudio de las intensidades de los voxels.
- Suavizado: Las imágenes segmentadas se suavizan utilizando un núcleo gaussiano isótropo. De esta forma, los datos presentan una distribución más gaussiana y cada voxel contiene el valor medio de la región colindante al mismo. Además, se compensa la inexactitud natural de la normalización espacial realizada.
- Análisis estadístico: se utiliza para comparar estadísticamente los dos grupos de sujetos analizados.

Aunque VBM está inicialmente ideado para comparar la materia gris en imágenes estructurales de resonancia magnética convencional, también se ha aplicado para detectar cambios localizados en imágenes de difusión, principalmente imágenes de FA. Para ello, solo hay que realizar todo el proceso, desde el registrado al análisis estadístico, partiendo de la imágenes de DTI o de parámetros escalares derivados, como la FA.

2.3.2. Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)

VBM (sección 2.3.1) presenta varios problemas a la hora de realizar comparaciones entre varios grupos. En primer lugar, existe la cuestión de si se

puede garantizar que al comparar el mismo voxel de dos volúmenes distintos, una vez registrados, se está comparando la misma parte de la materia blanca. Es decir, si el registrado ha sido exacto. Además, un segundo problema reside en la cantidad de suavizado que debe utilizarse para no afectar a los resultados.

TBSS [47], que al contrario que VBM no está ideado para imágenes anatómicas, sino directamente para DTI, trata de aliviar estos problemas de alineación y de suavizado de VBM. Para ello se alinean los datos de FA de todos los sujetos en un mismo espacio común utilizando un registrado no lineal. A continuación se estima a partir de todas las imágenes alineadas un esqueleto de FA media, que representa los haces de fibras en general comunes a todos los sujetos del estudio. Después se proyectan los datos de FA de cada sujeto sobre el esqueleto obtenido de manera que cada voxel del mismo toma el valor mayor de FA dentro de un área pequeña, cercana y perpendicular a la estructura del esqueleto. Finalmente se realiza el análisis estadístico voxel a voxel de los datos proyectados en el esqueleto.

Las fases de las que consta todo el proceso son las siguientes:

- **Preprocesamiento:** Deben alinearse todas las imágenes DWI de cada sujeto entre sí antes de realizar la estimación de las medidas de difusión. Esto permite corregir los movimientos de la cabeza durante la sesión y los efectos de las corrientes de Foucault (*eddy currents*) [37]. Después de esta prealineación se puede calcular el tensor de difusión y las medidas de difusión derivadas de él. Por último, extrae la parte correspondiente al cerebro a partir de las imágenes no sensibilizadas a la difusión.
- **Registrado:** Se lleva a cabo una alineación de las imágenes de FA de los sujetos sobre un mismo espacio. En primer lugar se realiza una alineación lineal que se aproxima a la solución óptima, seguida de una alineación no lineal para ajustar los detalles. Al igual que ocurría con VBM puede utilizarse uno de los volúmenes del estudio, crear un atlas a partir de todos los volúmenes o utilizar un atlas ya existente. En este caso no es necesaria una alineación perfecta.
- **Creación de la imagen de FA media y del esqueleto:** Las imágenes de FA registradas se promedian para crear una imagen de FA media. A partir de esta imagen se obtiene el esqueleto. Para ello, se va comparando el valor de cada voxel con sus vecinos, para seleccionar aquellos que tienen un valor mayor, formando así el esqueleto. Durante este proceso también se obtiene la dirección perpendicular a los tractos de las fibras,

que es aquella en la que la FA cambia con mayor rapidez. Por último, se utiliza un umbral del valor de la FA para restringir más el esqueleto.

- Proyección de las imágenes de FA de cada sujeto en el esqueleto o “esqueletonización”: En cada punto del esqueleto se busca, en la dirección perpendicular a los tractos, el valor máximo de FA y se asigna al voxel correspondiente. Esta búsqueda se limita al área cercana al esqueleto. De esta manera se resuelven los desajustes del registrado no lineal realizado previamente.
- Análisis estadístico: En este punto se puede realizar ya la comparación voxel a voxel de las imágenes de cada sujeto proyectadas en el esqueleto.

2.3.3. Conectómica

Un análisis por completo distinto a los dos anteriores es el de conectómica, que consiste en calcular medidas de la red neuronal, obteniendo las conexiones entre las distintas regiones de la corteza cerebral.

La conectómica trata la reproducción y el estudio de las conexiones neuronales. El concepto de conectoma humano, introducido por Sporns [48], hace referencia a la estructura, los elementos y las conexiones de la red que forma el cerebro humano [36]. Para estudiarlo se definen distintas regiones de la estructura cerebral que son los nodos de la red y, mediante tractografía, se analizan las conexiones de fibras entre ellos. A partir de los datos resultantes se puede crear una matriz de conectividad que los represente.

El estudio de la conectómica requiere de diversos pasos [25, 27, 40]:

- Procesado de los datos anatómicos: A partir de imágenes T1 de resonancia magnética convencional se puede realizar, estudiando las características de los tejidos y con un conocimiento previo de la estructura cerebral, una segmentación de la sustancia cerebral en materia blanca y materia gris, así como una parcelación de esta última en distintas regiones.
- Procesado de los datos de difusión: Utilizando las imágenes de DTI se puede obtener, como se explica en la sección 2.2.3, una estimación de las fibras que forman la materia blanca mediante la tractografía.
- Construcción de la red: Juntando la información de los dos pasos anteriores se pueden obtener las conexiones que conectan cada par de

regiones de la sustancia gris. Para ello se obtienen las fibras de la tractografía que empiezan o terminan en ambas regiones.

- Obtención de medidas de la red: Para cada conjunto de fibras entre dos regiones se pueden obtener distintos parámetros que las caractericen, como el número de fibras que lo constituye, la longitud media de las mismas o el valor medio de FA a lo largo de ellas, lo que proporciona distintas matrices de conectividad. También se pueden obtener valores para que caractericen cada región considerando todas sus conexiones.
- Análisis estadístico: Finalmente, y al igual que ocurría en los casos de VBM (sección 2.3.1) y TBSS (sección 2.3.2), para comparar distintos grupos de sujetos se lleva a cabo una comparación estadística de las distintas medidas obtenidas.

Capítulo 3

Análisis de DTI con TBSS

3.1. Proceso

El primer análisis realizado en este proyecto ha sido utilizando TBSS. Un esquema del proceso puede verse en la figura 3.1. El primer paso es obtener las distintas medidas escalares a partir de los tensores, tanto la FA (1) como otras (2). A continuación se realiza el registrado de todos los volúmenes de FA sobre un mismo espacio (3) y se calcula la imagen de FA media a partir de la cual se obtiene el esqueleto (4). Un registrado similar se realiza con las demás medidas (5). Una vez creado el esqueleto de FA media se utiliza tanto para la esqueletonización de las imágenes de FA (6) como la de las demás medidas (7). Finalmente, con todos los pasos anteriores realizados para todos los sujetos del estudio, se realiza el análisis estadístico de las distintas medidas estudiadas (8) (9). Para ello se comparan las imágenes esqueletonizadas de todas las medidas entre los distintos grupos.

Para llevar a cabo todo el proceso de TBSS se han creado dos *scripts*. El primero de ellos (A.1) realiza el preprocesado de los datos y los primeros pasos de TBSS, que consisten en el registrado de todos los volúmenes en uno y el cálculo de la FA media. Puesto que en este punto se debe escoger uno o más umbrales para el esqueleto de FA a utilizar, se emplea el segundo *script* (A.2) que se encarga de la proyección de los volúmenes sobre el esqueleto y del análisis estadístico. El estudio propiamente dicho con TBSS se realiza por completo con FSL, pero la preparación previa de los datos se lleva a cabo tanto con Slicer como con FSL.

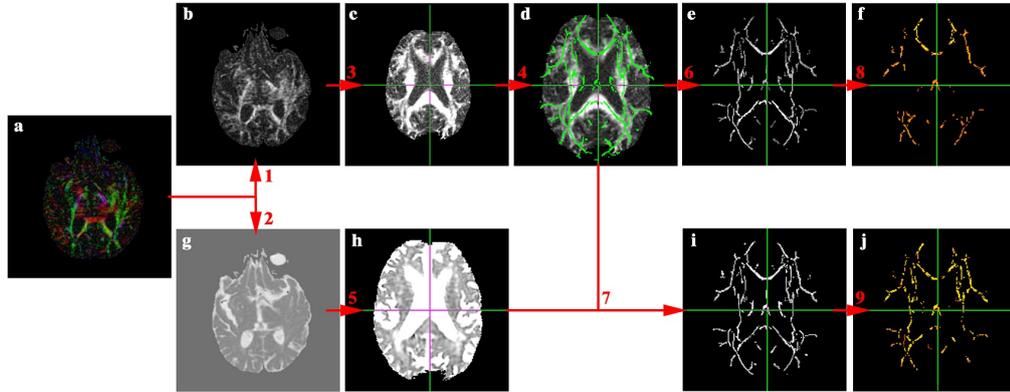


Figura 3.1: Esquema del proceso del análisis mediante TBSS: Tensores (a), FA (b), FA registrada (c), esqueleto (en verde sobre la imagen de la FA registrada) (d), FA esqueletonizada (e), resultados estadísticos resultantes de la FA (f), otras medidas (traza) (g), otras medidas registradas (h), otras medidas esqueletonizadas (i) y resultados estadísticos resultantes de las otras medidas (j).

3.2. Preparación de los datos

Las medidas que se estudian, además de la anisotropía fraccional (1), son la traza (2), el modo (3), la medida lineal (4), la difusividad axial (5) y la difusividad radial (6). Un ejemplo de estas medidas puede verse en la figura 3.2. Estas medidas se obtienen de los tensores, empleando Slicer.

Tanto los archivos con los tensores como los que contienen la información de las medidas escalares derivadas de los mismo tienen formato `.nhdr`. Para poder realizar en análisis TBSS con FSL deben transformarse a formato NIfTI (extensión `.nii`), para lo que se utiliza Slicer de nuevo. Además, las imágenes deben estar orientadas de acuerdo al estándar empleado por FSL, por lo que después del cambio de formato se lleva a cabo la reorientación de los datos. El preprocesado de las imágenes de FA obtenidas a partir de los tensores se muestra en la figura 3.3.

Dado que las medidas estudiadas tanto en el análisis mediante TBSS como mediante VBM son las mismas, este procesado previo de los datos sirve en ambos casos. Una vez obtenidas y convertidas al formato adecuado, se emplean para los dos procesos.

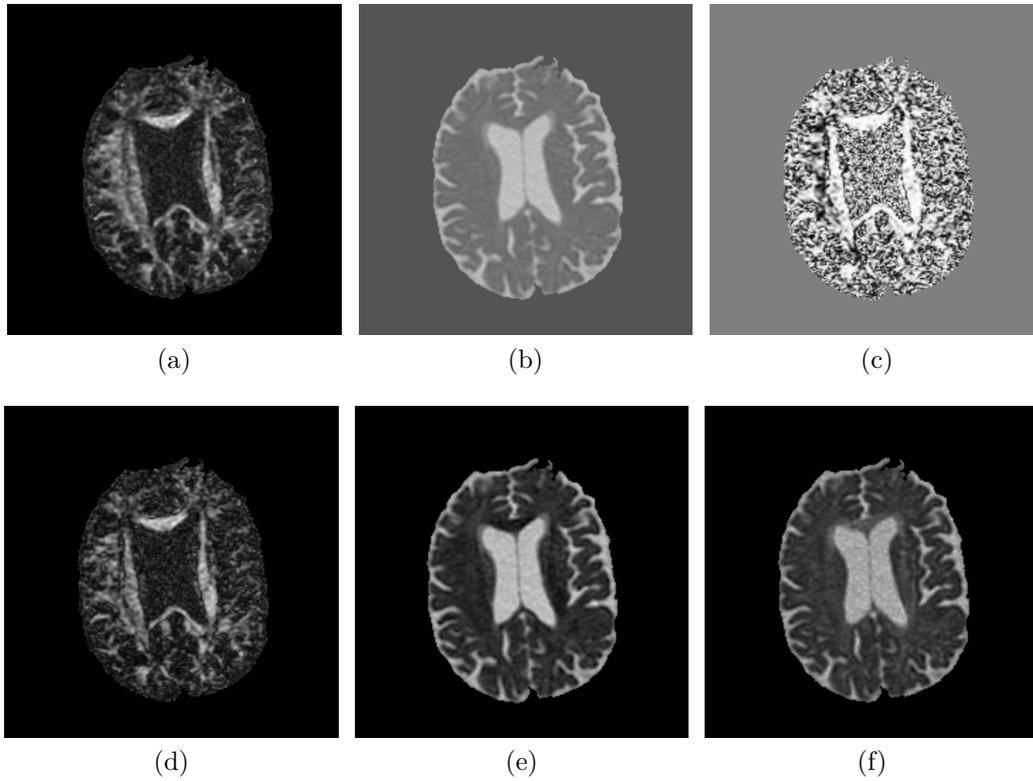


Figura 3.2: Medidas escalares obtenidas a partir de los tensores: FA (a), traza (b), modo (c), LM (d), RD (e) y AD (f).

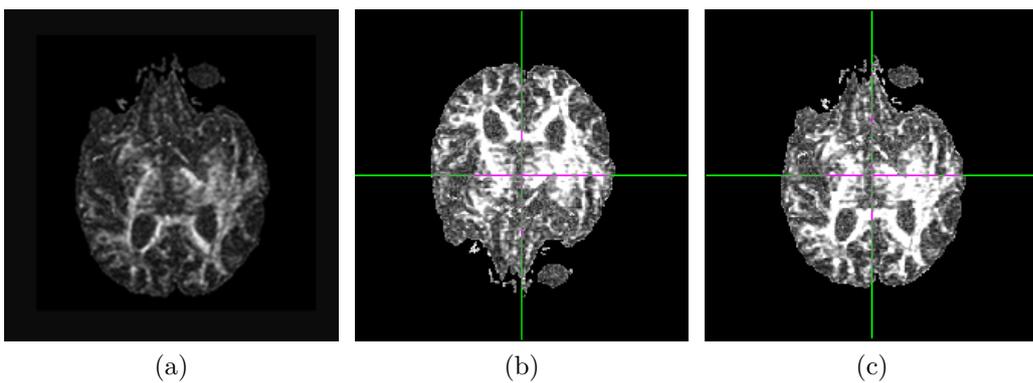


Figura 3.3: Imágenes generadas en el preprocesado de los datos: FA en formato NRRD en Slicer (a), FA en formato NIfTi en FSL (b), FA en formato NIfTi reorientado en FSL (c). La FA no cambia, solo la orientación del volumen. Los cambios visualizados se deben únicamente a la representación de los datos con distintos *softwares*.

3.3. Análisis TBSS

Una vez preparados los datos puede realizarse el proceso de TBSS mediante FSL [17]. Este consta de cuatro pasos distintos. Los datos generados en estos pasos se muestran en la figura 3.4.

- Preprocesado: Erosiona levemente las imágenes de FA y pone a cero los límites de las imágenes para eliminar posibles valores extremos de los tensores.
- Registrado: Registra de manera no lineal con FNIRT (*FMRIB's Non-linear Registration Tool*) [7] todas las imágenes de FA en un mismo espacio. Aunque puede obtenerse un espacio común alineando todas las imágenes entre sí, en este estudio se utilizó el espacio estándar FMRIB58_FA [6] definido en FSL.
- Postregistrado: Aplica las transformaciones no lineales calculadas en el paso anterior a todas las imágenes, obteniendo así una versión de las mismas en el espacio de estandarización elegido. A continuación, se calcula la media de todas las imágenes de FA y se crea el esqueleto. Al usar el espacio estándar FMRIB58_FA cabe la posibilidad de usar el esqueleto asociado al mismo, en lugar del obtenido a partir de la imagen de FA media. Esta última opción es la que se utiliza en este estudio.
- Preestadísticas: Aplica el umbral indicado al esqueleto de FA, definiendo el conjunto de voxels utilizados en el resto del proceso. Este umbral especifica el valor de FA que deben superar los voxels del esqueleto para utilizarse en el análisis. A continuación, cada imagen registrada se proyecta sobre el esqueleto, dando lugar a las imágenes de FA esqueletonizadas. En el estudio se ha realizado el análisis con tres umbrales diferentes, 2000, 3000 y 4000, que corresponden con un valor de FA de 0,2, 0,3 y 0,4 respectivamente, para ver cómo afecta a los resultados. Cuanto mayor es el valor del umbral, más restrictivo es y menos voxels se utilizan (figura 3.5).

Estos cuatro pasos trabajan con las imágenes de FA. Para realizar la comparación también con las otras cinco medidas se emplea el mismo esqueleto obtenido con la FA, así como las transformaciones para registrar los volúmenes. Se aplican estas últimas a las imágenes de las distintas medidas, las cuales son después proyectadas sobre el esqueleto, utilizando el umbral establecido. De esta manera se obtienen también las imágenes esqueletonizadas

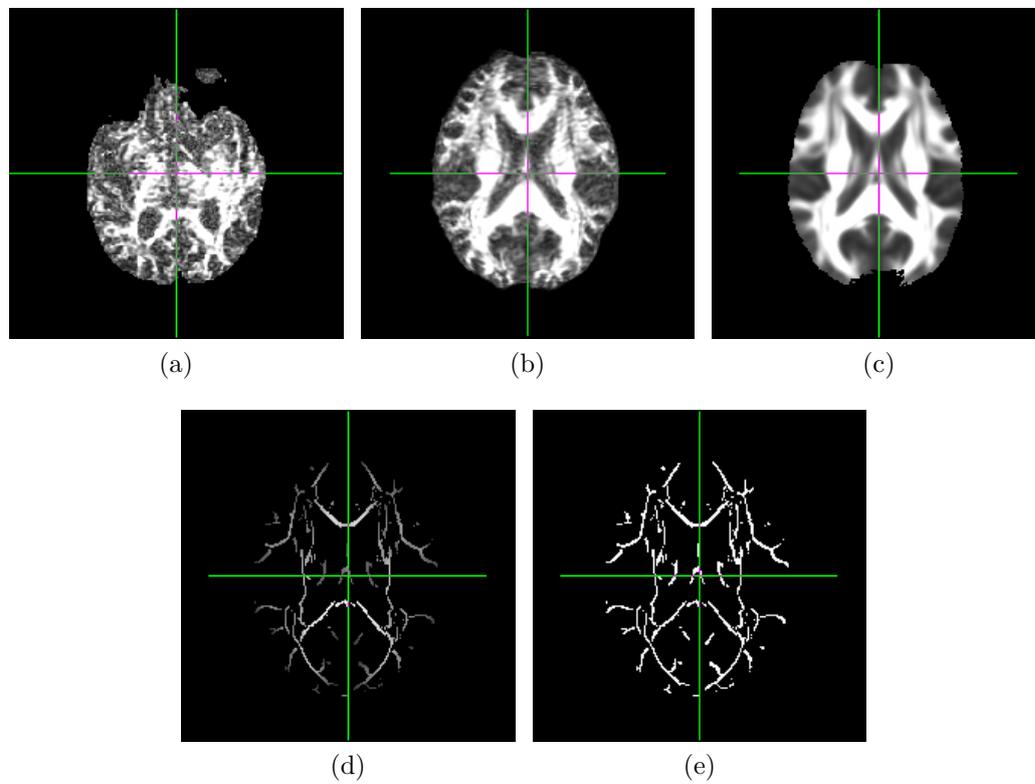


Figura 3.4: Imágenes generadas en el proceso de TBSS: FA tras el preprocesado (a), FA tras el registrado (b), FA media tras el postregistrado (c), esqueleto de FA (d), máscara del esqueleto de FA (e).

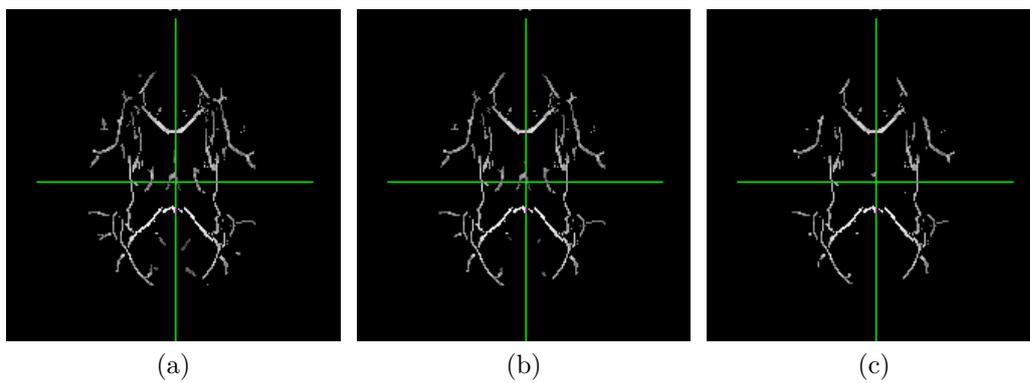


Figura 3.5: Imágenes de FA esqueletonizadas con los distintos umbrales: 2000 (a), 3000 (b) y 4000 (c).

de las distintas medidas a comparar.

Una vez obtenidas las versiones eskeletonizadas de todas las medidas y para todos los sujetos se realiza el análisis estadístico. Para ello, se comparan los distintos grupos de sujetos, de dos en dos, mediante la herramienta *randomise* [51] de FSL. *Randomise* realiza la comparación voxel a voxel de los voxels pertenecientes a la máscara indicada, en este caso, el esqueleto de FA media obtenido anteriormente. Como resultado se obtienen distintos volúmenes del esqueleto con valores del *p-value* en cada voxel y que indican si existen diferencias estadísticamente significativas entre cada par de grupos comparados.

El *p-value* es una medida de la probabilidad de rechazar la hipótesis nula, siendo ésta cierta. Es decir, mide la probabilidad de hallar una diferencia cuando en realidad los datos comparados han sido generados por la misma distribución. Valores pequeños del *p-value* indican que es muy improbable obtener una muestra como la comparada siendo la hipótesis nula cierta, mientras que valores altos indican que es probable. Normalmente, se establece que las diferencias encontradas son estadísticamente significativas si se cumple que $p_{value} < 0,05$, lo que indica que hay un 5% de probabilidades de haber encontrado la diferencia debido al azar y no porque exista realmente. Cuando se comparan distintos grupos el valor que no debe superar el *p-value* para considerar que la hipótesis nula es falsa disminuye, puesto que la probabilidad de que para alguno de los grupos haya diferencias significativas aumenta.

La herramienta *randomise* lleva a cabo una corrección por comparaciones múltiples que reduce el valor máximo que no debe superar el *p-value* para considerar las diferencias estadísticamente significativas. Dicha corrección es necesaria ya que se están realizando tantos test de hipótesis con voxels se comparan y, de no hacerse, aparecerían muchos falsos positivos.

3.4. Resultados

Los resultados obtenidos de todo el proceso permiten ver en qué zonas del esqueleto de FA y entre qué dos grupos hay diferencias significativas y cuál es el *p-value* asociado a esas diferencias. Con el análisis realizado se han encontrado diferencias entre los grupos A y C para las seis medidas estudiadas, y entre los grupos A y D para la FA y la RD. Entre las demás combinaciones de grupos no aparecen diferencias para ninguna de las medidas.

Cabría esperar que se encontrasen más fácilmente diferencias entre los grupos A y D que entre los grupos A y C, cosa que, por el contrario, sucede al revés. Además, las diferencias encontradas entre los grupos A y C y entre A y D hacen pensar que podrían obtenerse también algunas entre los grupos A y E. Sin embargo, este no es el caso. Las menores diferencias encontradas entre A y D así como la ausencia de ellas entre A y E pueden deberse al número de sujetos de cada grupo. Mientras que en los grupos A y C hay más de 20 sujetos en cada uno, en D y E el número de ellos es mucho menor (7 y 1, respectivamente). Esto afecta negativamente a los resultados del análisis estadístico, puesto que se dispone de muy pocos sujetos para comparar y por tanto no hay potencia estadística suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos.

En las imágenes 3.6 y 3.7 se presenta, para los tres umbrales utilizados en el estudio, una muestra de las diferencias entre los grupos A y C para las seis medidas. Cada columna es un umbral (2000, 3000 y 4000) y cada fila una medida distinta (FA, traza, modo, LM, RD y AD). En ellas, el esqueleto aparece representado en grises, mientras que los píxeles en color muestran aquellos voxels en los que existen diferencias. Cuando el color de los píxeles es en tonos azules se debe a que el valor de la medida en los sujetos del grupo A es mayor que en los del grupo C, mientras que cuando el tono es entre rojo y amarillo la medida en los sujetos del grupo A es menor que en los del grupo C. Además, cuanto más claro es el color del píxel, menor es el *p-value* que representa y, por tanto, la diferencia es más estadísticamente probable. El umbral empleado para el *p-value* es, en todos los casos, 0,05 corregido teniendo en cuenta las comparaciones múltiples realizadas.

La imagen 3.8 muestra las diferencias entre los grupos A y D solo para las medidas FA y RD, puesto que para las demás no se han encontrado diferencias. El significado de los colores es similar a lo explicado para las imágenes 3.6 y 3.7. Además cabe destacar que, en este caso, para valores altos del umbral no aparecen diferencias, mientras que para valores más bajos sí.

Estos datos muestran que se han encontrado diferencias entre los grupos de controles sanos y los de pacientes con enfermedad de Alzheimer leve y moderada. En estos casos, las medidas de FA, modo y LM tienden a ser mayores en los controles sanos mientras que la traza, la RD y la AD se comportan a la inversa. Las medidas que mayores diferencias presentan son la FA, la traza y la RD, mientras que el modo y la LM son las que menos.

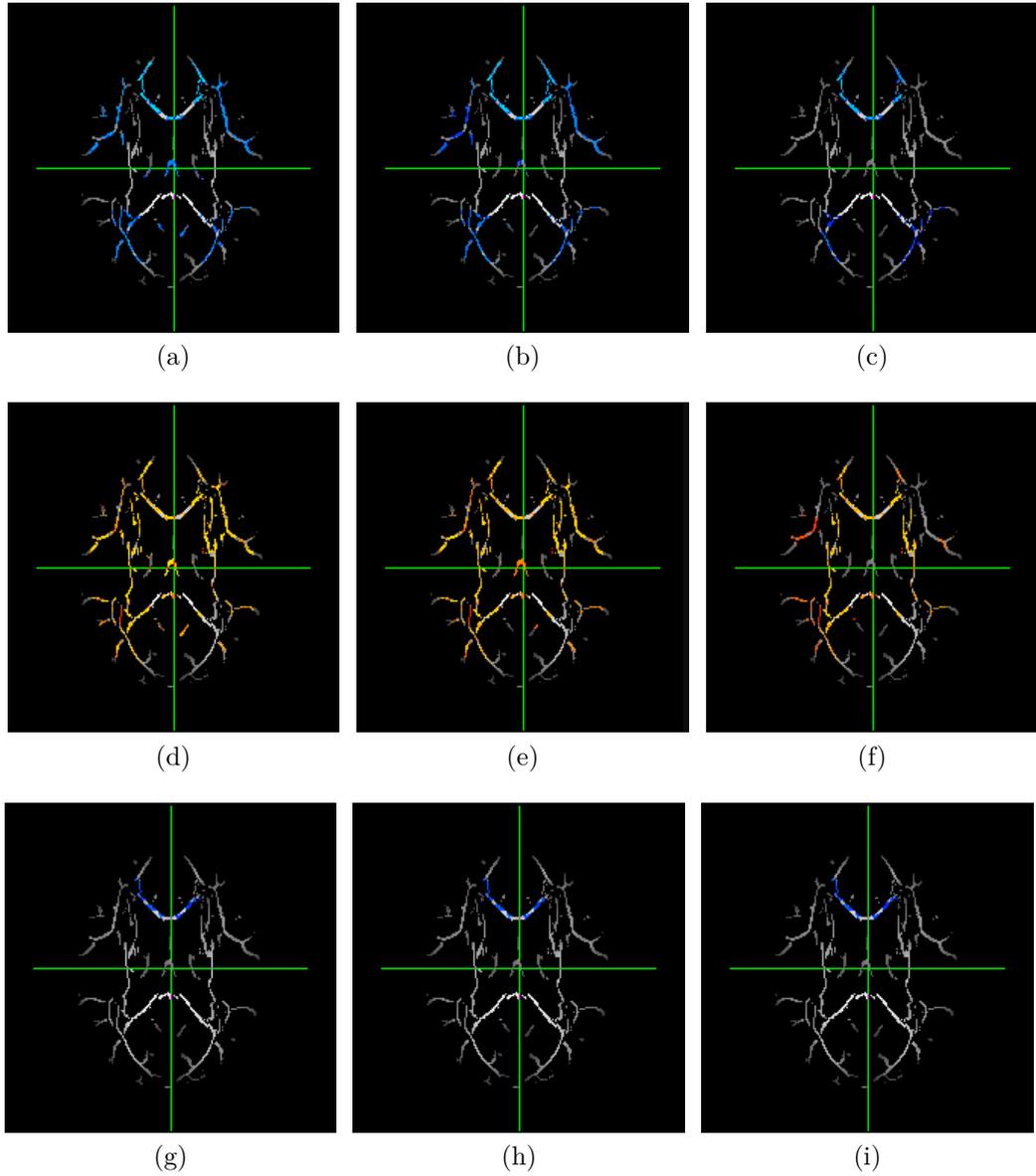


Figura 3.6: Diferencias encontradas con TBSS en FA, traza y modo entre los grupos A y C: FA 2000 (a), FA 3000 (b), FA 4000 (c), traza 2000 (d), traza 3000 (e), traza 4000 (f), modo 2000 (g), modo 3000 (h) y modo 4000 (i).

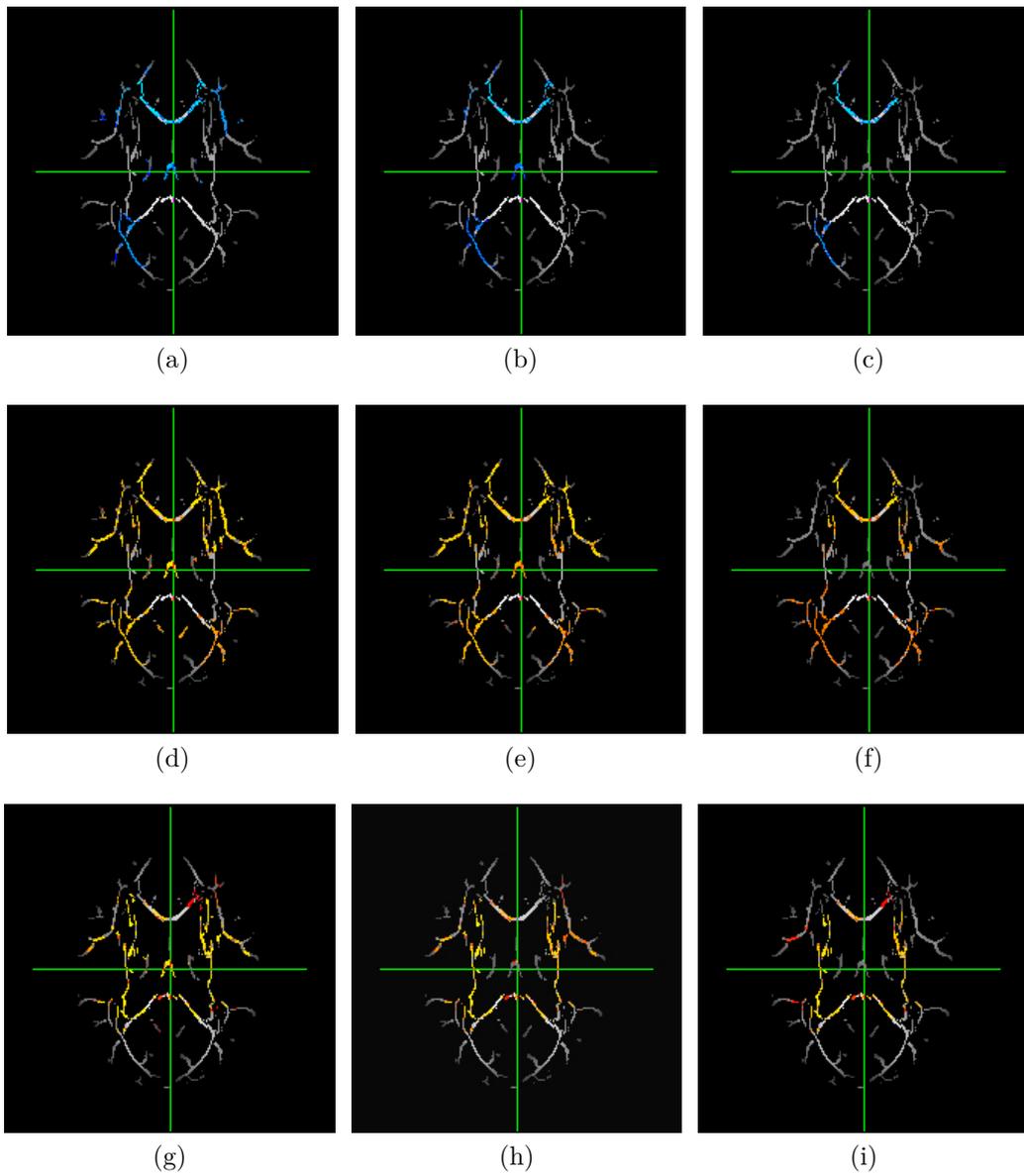


Figura 3.7: Diferencias encontradas con TBSS en LM, RD y AD entre los grupos A y C: LM 2000 (a), LM 3000 (b), LM 4000 (c), RD 2000 (d), RD 3000 (e), RD 4000 (f), AD 2000 (g), AD 3000 (h) y AD 4000 (i).

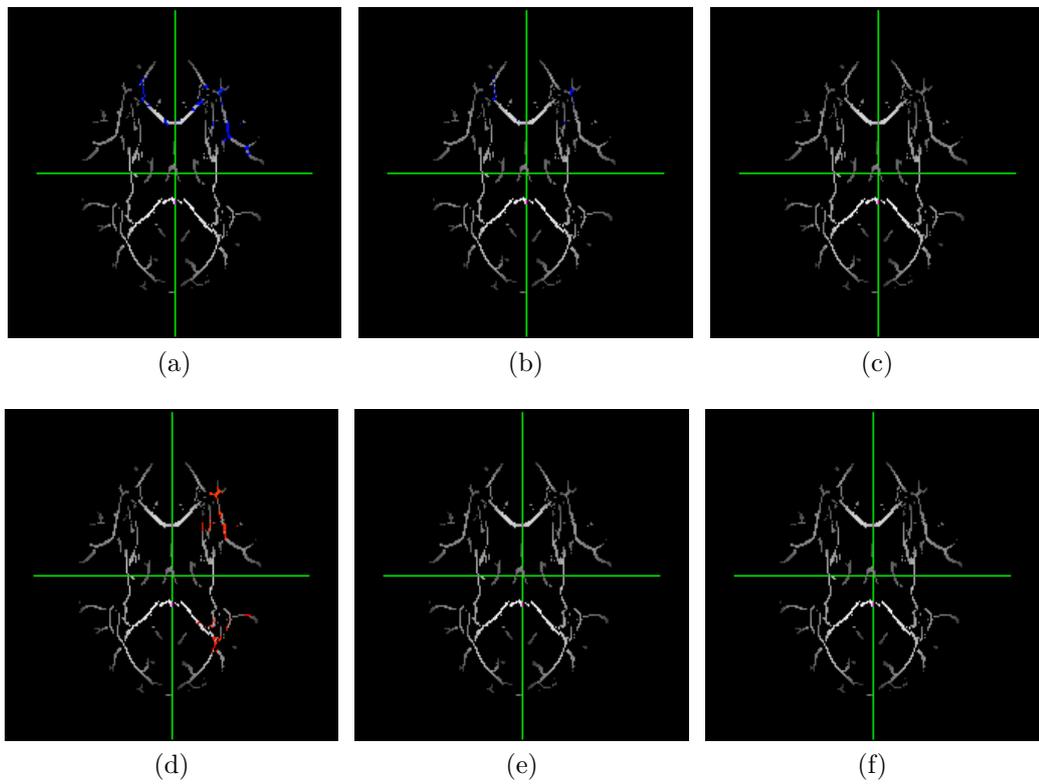


Figura 3.8: Diferencias encontradas con TBSS en FA y RD entre los grupos A y D: FA 2000 (a), FA 3000 (b), FA 4000 (c), RD 2000 (d), RD 3000 (e) y RD 4000 (f).

Los efectos del umbral empleado resultan en una cantidad distinta de voxels comparados, centrándose estos más en el interior del cerebro a medida que el umbral aumenta. Aunque un umbral mayor significa que las zonas a comparar son las de mayor FA media y tienden a ser las más comunes entre todos los sujetos, también reduce el volumen comparado, haciendo que para algunas medidas, al aumentar el umbral no aparezca ninguna diferencia, mientras que con un umbral inferior sí aparecen.

En cuanto a las zonas del cerebro donde aparecen las diferencias, entre los grupos A y C para todas las medidas salvo el modo éstas se encuentran distribuidas por todo el volumen de materia blanca, mientras que en el modo tienden a aparecer hacia la parte anterior del cerebro. Entre los grupos A y D las diferencias encontradas se centran principalmente en la parte anterior y el hemisferio izquierdo.

Para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos, se han calculado una serie de medidas cuantitativas a partir de los mismos. Se tienen así cinco parámetros distintos para cada una de las comparaciones entre dos grupos, para cada medida y para cada umbral utilizado.

El primero de esos parámetros es el número de voxels en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. También se ha calculado el valor medio del *p-value* de todos esos voxels. Por otro lado, se ha obtenido el número de clústeres, o conjuntos de voxels colindantes con diferencias, así como el tamaño medio de todos ellos y el valor medio del *p-value* medio de cada uno.

En las gráficas de las figuras 3.9 y 3.10 se muestran estos parámetros para las comparaciones entre los grupos A y C y entre A y D respectivamente, que son aquellos entre los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Las gráficas, en orden descendente, representan los distintos parámetros: número de voxels con diferencias, *p-value* medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y *p-value* medio de los clústeres. El eje X de las gráficas corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Por último, cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

Estos resultados confirman las afirmaciones anteriores acerca de las medidas que presentan mayores diferencias y el efecto del umbral. Además, puede verse como, a medida que aumenta el valor del umbral, el *p-value* tiende, en general, a aumentar. En cuanto a los clústeres, resulta claro que cuantos más

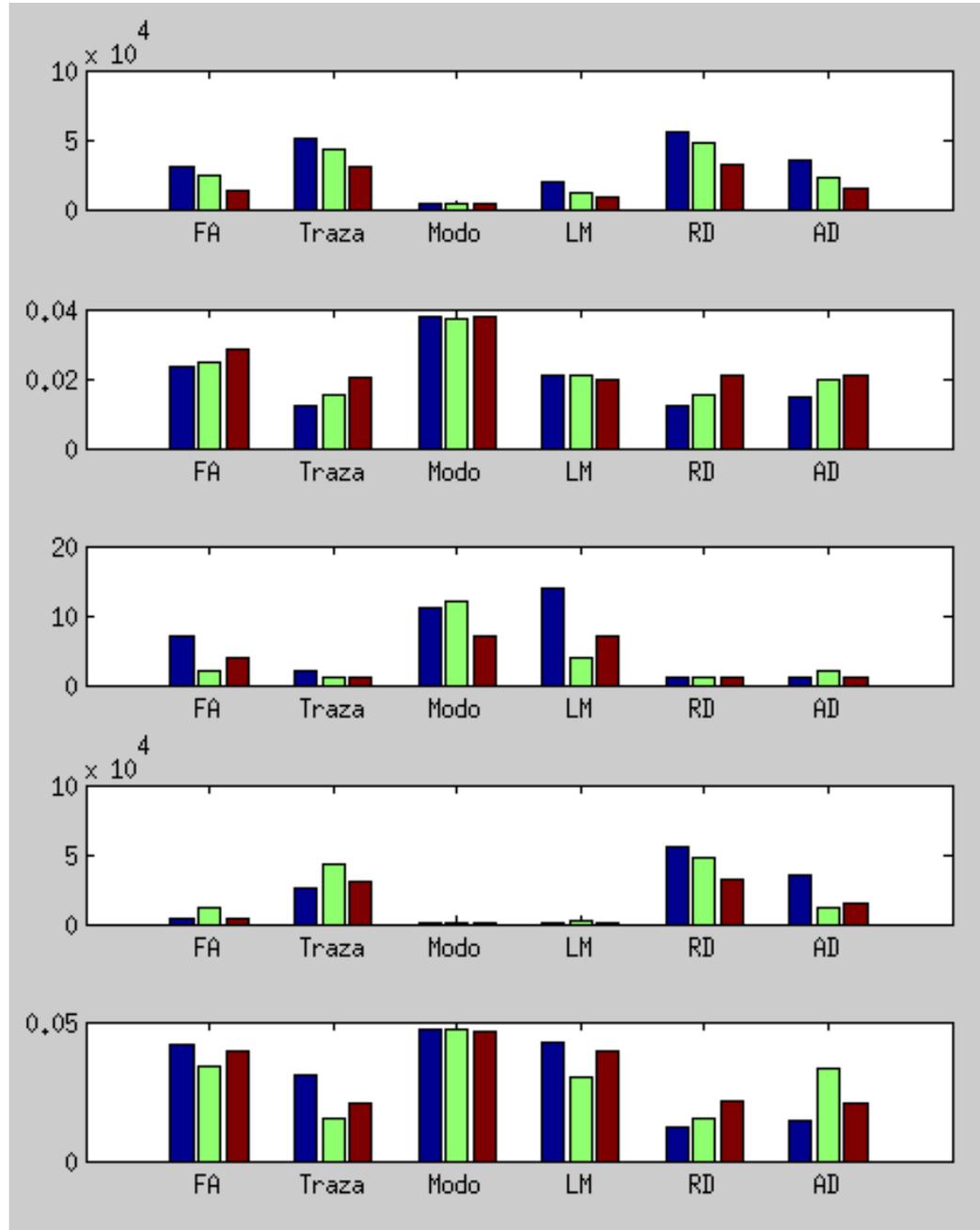


Figura 3.9: Diferencias encontradas con TBSS entre los grupos A y C. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

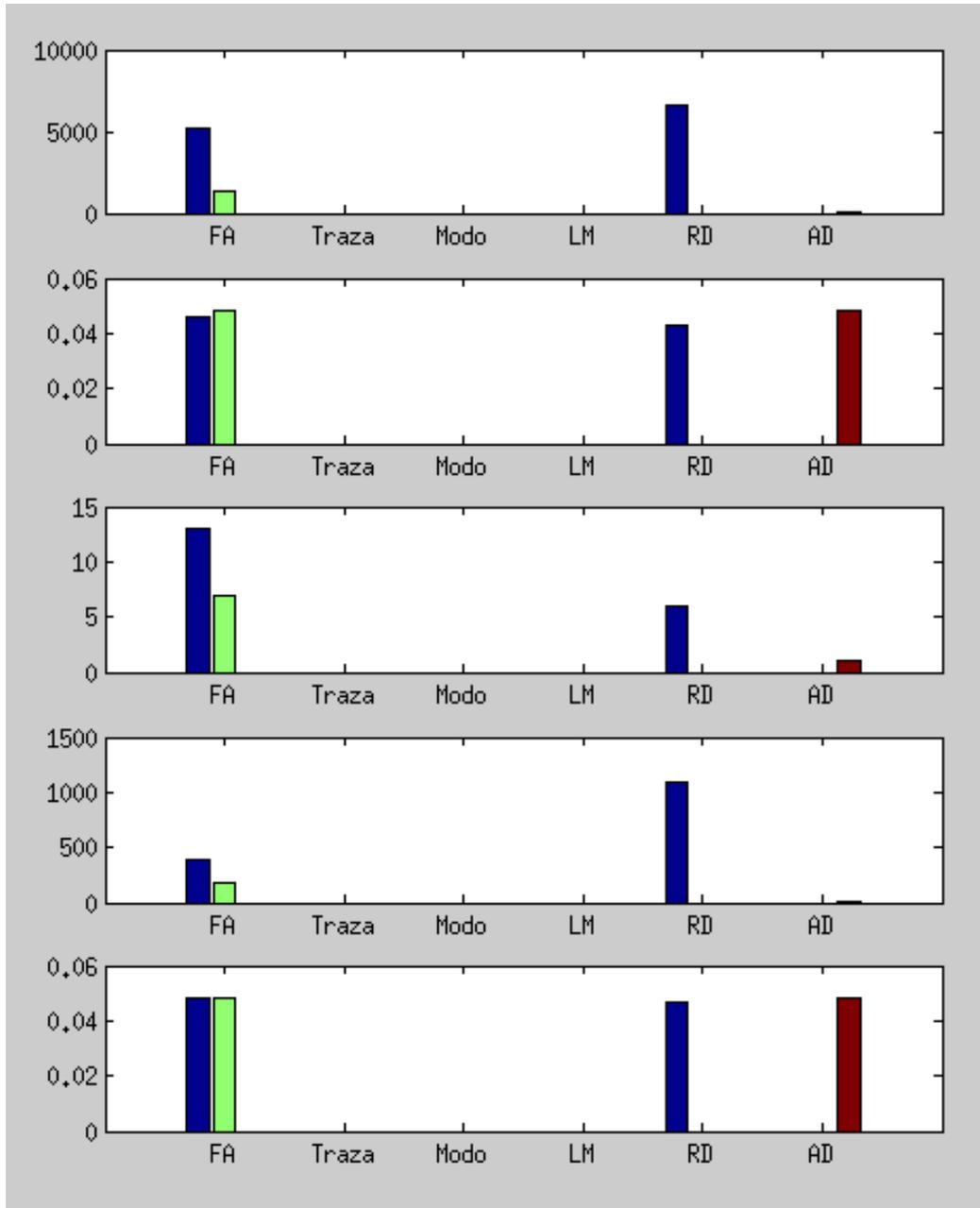


Figura 3.10: Diferencias encontradas con TBSS entre los grupos A y D. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

hay, menor es su tamaño.

En el cuadro 3.1 se muestran, de manera resumida, los grupos entre los que se han encontrado diferencias para las distintas medidas estudiadas y los umbrales empleados, así como el número de voxels con diferencias encontrados.

	Umbral = 2000	Umbral = 3000	Umbral = 4000
FA	$A > C$ (30621) $A > D$ (5152)	$A > C$ (24688) $A > D$ (1313)	$A > C$ (13575)
Traza	$A < C$ (50065)	$A < C$ (43034)	$A < C$ (29704)
Modo	$A > C$ (4236)	$A > C$ (4134)	$A > C$ (3321)
LM	$A > C$ (19522)	$A > C$ (12445)	$A > C$ (9087)
RD	$A < C$ (55443) $A < D$ (6561)	$A < C$ (47956)	$A < C$ (32005)
AD	$A < C$ (34394)	$A < C$ (23310)	$A < C$ (15365) $A < D$ (12)

Cuadro 3.1: Diferencias encontradas con TBSS

Capítulo 4

Análisis de DTI con VBM

4.1. VBM empleando TBSS

Existen herramientas concretas para el análisis con VBM. Sin embargo, dado que se trata de realizar un registro de todos los volúmenes a comparar, proceso que también se lleva a cabo con TBSS, se utilizan parte de los datos generados durante el análisis con TBSS y también se emplean las mismas herramientas *software*. En realidad, el estudio con VBM se realiza usando TBSS de manera que utilice una máscara de la sustancia blanca (o una algo más restrictiva), en lugar del esqueleto generado. Es por ello que VBM se lleva a cabo después que TBSS, y no antes, como parecería lógico dada su mayor simplicidad. Además, en VBM también es necesario aplicar, a la hora de realizar el análisis estadístico, una corrección por comparaciones múltiples. Puesto que la herramienta *randomise* utilizada en TBSS lo incluye, también se emplea en este nuevo análisis.

Aunque la función de FSL utilizada está desarrollada para el análisis con TBSS, aquí ha sido utilizada para VBM realizando algunas pequeñas modificaciones en su utilización. Los pasos de registro y cálculo de la imagen de FA media realizados por TBSS también sirven para VBM. Por tanto, se reutilizan los datos generados en el anterior análisis de las distintas medidas registradas en un mismo espacio, así como las imágenes de FA media obtenidas. Sin embargo, en lugar de generar un esqueleto de la materia blanca, se crea una máscara a partir de la imagen de FA media que abarque en mayor o menor medida gran parte de la materia blanca. Aunque VBM utilizaría una máscara de la materia blanca al completo, aquí se utilizan también otras algo más restrictivas que, sin llegar al nivel del esqueleto de TBSS, reducen el volumen comparado empleando distintos umbrales, para comprobar su efecto

en los resultados. Es esta máscara la que se utiliza, en lugar del esqueleto, en el proceso del análisis estadístico. Por tanto, no se lleva a cabo el paso de esqueletonización de las distintas medidas, sino que se aplica la máscara directamente sobre los volúmenes registrados.

4.2. Proceso

La figura 4.1 muestra un esquema del proceso del análisis mediante VBM. Como se explica en la sección 4.1 los primeros pasos son similares a los realizados con TBSS y se reutilizan los datos generados. El primer paso consiste en la obtención de las distintas medidas escalares a partir de los tensores (1) (2). A continuación se lleva a cabo el registro de todos los volúmenes de FA, así como de las demás medidas, sobre un mismo espacio (3) (4) y se calcula la imagen de FA media a partir de la cual se obtiene la máscara de FA (5). Por último, tras realizar todos los pasos anteriores con todos los sujetos del estudio, se realiza el análisis estadístico de las distintas medidas estudiadas (6) (7). Para ello se comparan entre los distintos grupos los voxels de los volúmenes de las distintas medidas incluidos en la máscara.

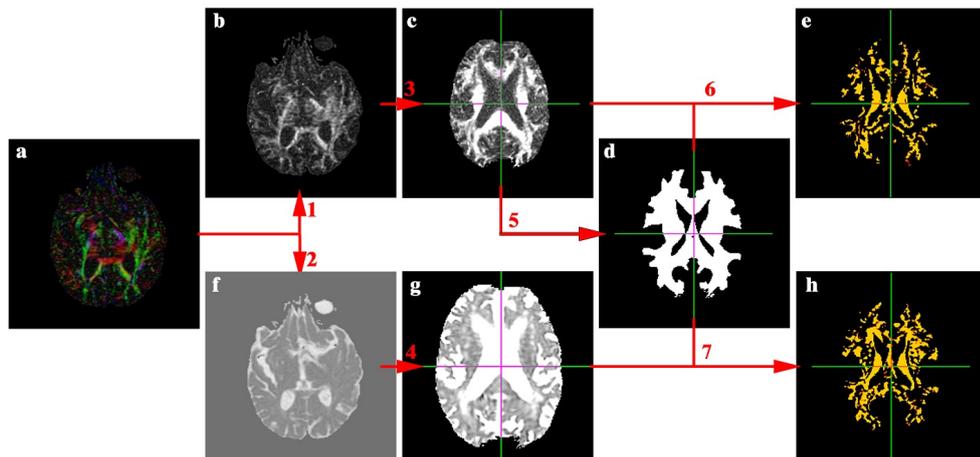


Figura 4.1: Esquema del proceso del análisis mediante VBM: Tensores (a), FA (b), FA registrada (c), máscara de FA (d), resultados estadísticos resultantes de la FA utilizando la máscara (e), otras medidas (traza) (f), otras medidas registradas (g) y resultados estadísticos resultantes de las otras medidas utilizando la máscara (h).

Para llevar a cabo el estudio con VBM se ha creado un tercer *script* (A.3).

Éste se encarga de la creación de la máscara de FA con el umbral indicado y del análisis estadístico. Los datos necesarios para que se lleve a cabo el análisis deben haber sido creados previamente con los dos *scripts* previos (A.1 y A.2). Al igual que ocurría en el caso de TBSS, el estudio con VBM se realiza por completo con FSL.

4.3. Análisis VBM

Como ya se ha dicho, los pasos de preparación de los datos, preprocesado, registrado y postregistrado son los mismos que en TBSS, por lo que se utilizan los datos generados en el análisis anterior hasta ese punto, tanto para la FA como para las demás medidas. Aunque el postregistrado de TBSS genera el esqueleto, en este análisis no se utiliza.

El principal cambio entre el análisis realizado anteriormente con TBSS y el realizado con VBM consiste en la creación de una máscara. Ésta se genera a partir del volumen de FA media utilizando la función de FSL *fslmaths* [10]. Esta función crea una imagen con aquellos voxels que superan un umbral dado en el volumen de FA media y después la binariza dando lugar a la máscara empleada. En este estudio se han utilizado tres valores distintos para el umbral, 2000, 3000 y 4000, que corresponden con valores de la FA de 0,2, 0,3 y 0,4 respectivamente (figura 4.2). De nuevo, al igual que sucedía con los umbrales del esqueleto en TBSS, cuanto mayor es el valor del umbral, más restrictivo es y menos voxels se utilizan.

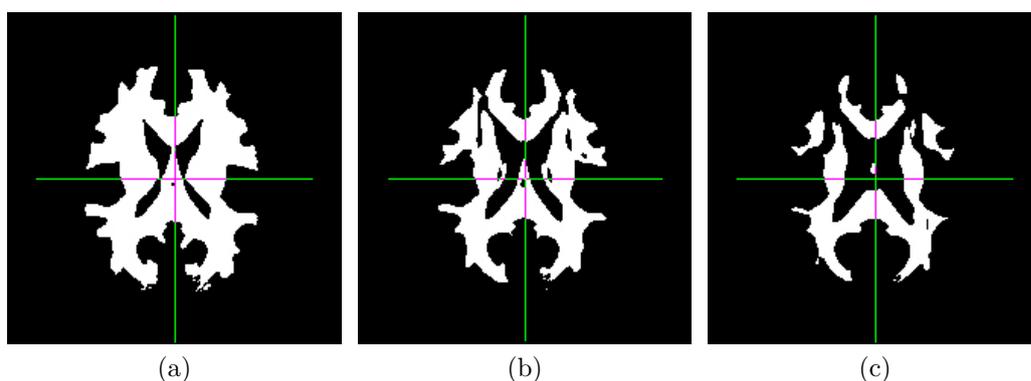


Figura 4.2: Máscaras de FA con los distintos umbrales: 2000 (a), 3000 (b) y 4000 (c).

Con la máscara generada, se procede al análisis estadístico. En este ca-

so lo que se comparan no son las imágenes eskeletonizadas, sino los vóxeles pertenecientes a la máscara de las imágenes registradas. Como resultado se obtienen, para cada medida, distintos volúmenes de la máscara con valores del *p-value* en cada voxel, que indican si existen diferencias significativas ($p_{value} < 0,05$ con la corrección por comparaciones múltiples) entre cada par de grupos comparados.

4.4. Resultados

Los resultados obtenidos permiten ver en qué zonas de la materia blanca y entre qué dos grupos de sujetos aparecen diferencias estadísticamente significativas. Al igual que con TBSS, con el análisis VBM se han encontrado diferencias entre los grupos A y C para las seis medidas estudiadas. Asimismo, también aparecen diferencias para todas las medidas entre los grupos A y D, aunque en menor media y dependiendo del umbral utilizado.

Las imágenes 4.3 y 4.4 muestran, para los tres umbrales utilizados, una muestra de las diferencias entre los grupos A y C para las seis medidas estudiadas, mientras que las imágenes 4.5 y 4.6 hacen lo propio con los grupos A y D. Cada columna es un umbral (2000, 3000 y 4000) y cada fila una medida distinta (FA, traza, modo, LM, RD y AD). En ellas, se muestra la máscara utilizada en blanco, mientras que los píxeles en color muestran aquellos vóxeles en los que existen diferencias. Cuando el color de los píxeles es en tonos azules se debe a que el valor de la medida en los sujetos del grupo A es mayor que en los del grupo C o D, mientras que cuando el tono es entre rojo y amarillo la medida en los sujetos del grupo A es menor. Además, cuanto más claro es el color del píxel, menor es el *p-value* que representa y, por tanto, la diferencia es más estadísticamente probable.

Los resultados obtenidos muestran diferencias entre los grupos de controles sanos y los de pacientes con enfermedad de Alzheimer leve y moderada. Las medidas de FA, modo y LM tienden a ser mayores en los controles sanos mientras que la traza, la RD y la AD son menores en los controles sanos. Las medidas que mayores diferencias presentan son la FA y la LM, mientras que el modo y la AD son las que menos. En general, las diferencias aparecen repartidas por todo el volumen de la materia blanca.

Los distintos umbrales empleados para la creación de la máscara afectan a la cantidad de volumen de materia blanca comparada. Cuanto mayor es

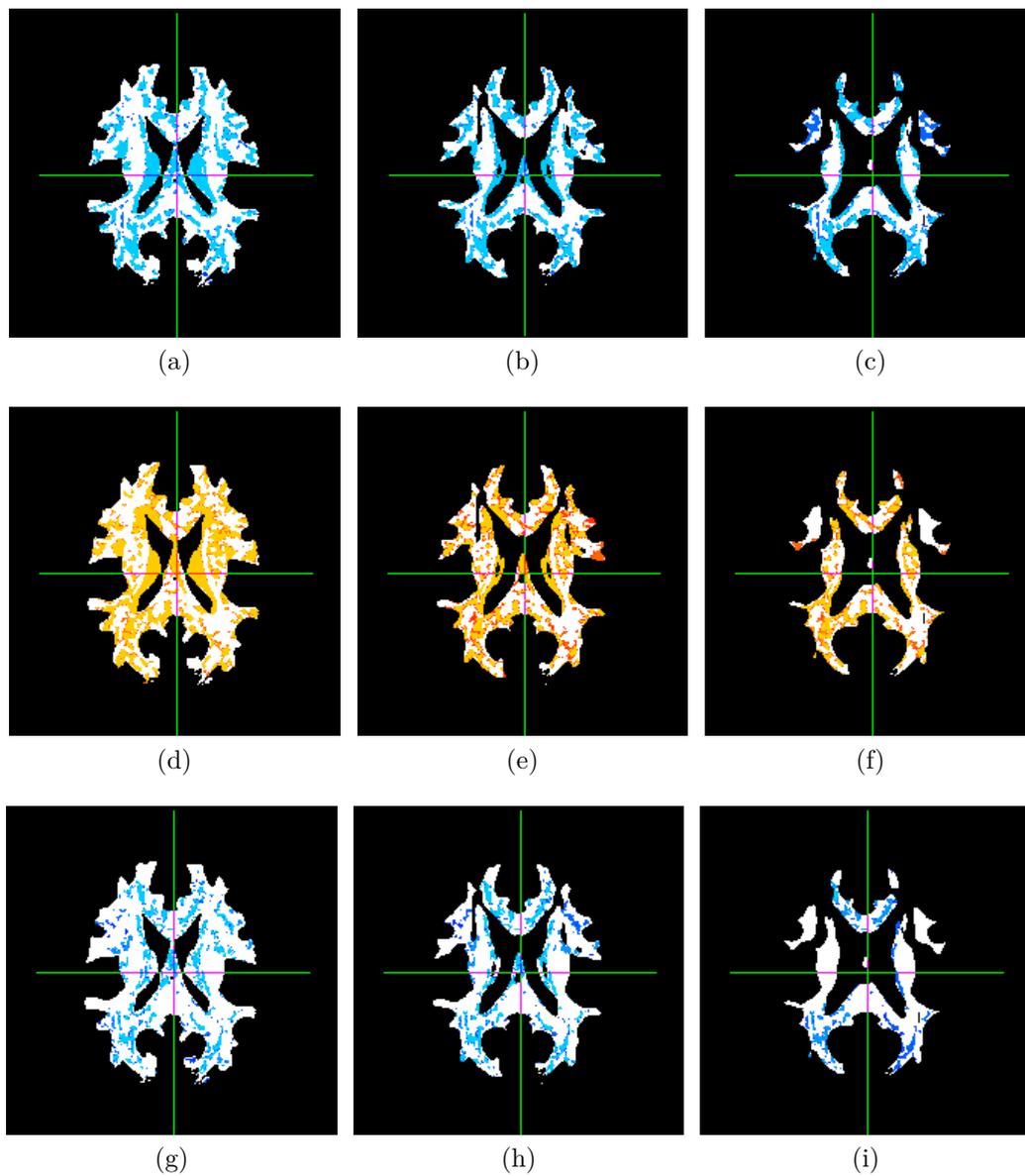


Figura 4.3: Diferencias encontradas con VBM en FA, traza y modo entre los grupos A y C: FA 2000 (a), FA 3000 (b), FA 4000 (c), traza 2000 (d), traza 3000 (e), traza 4000 (f), modo 2000 (g), modo 3000 (h) y modo 4000 (i).

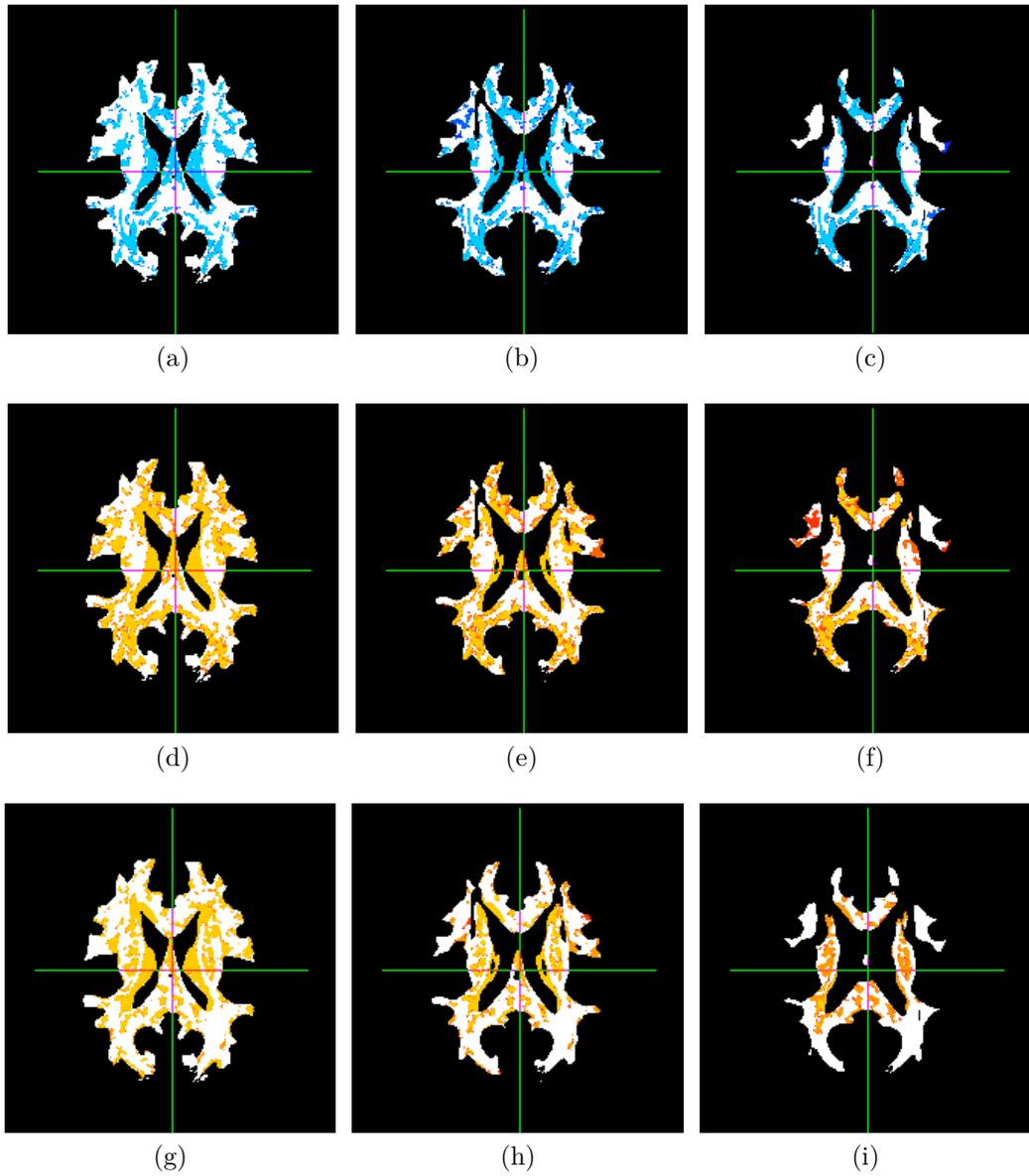


Figura 4.4: Diferencias encontradas con VBM en LM, RD y AD entre los grupos A y C: LM 2000 (a), LM 3000 (b), LM 4000 (c), RD 2000 (d), RD 3000 (e), RD 4000 (f), AD 2000 (g), AD 3000 (h) y AD 4000 (i).

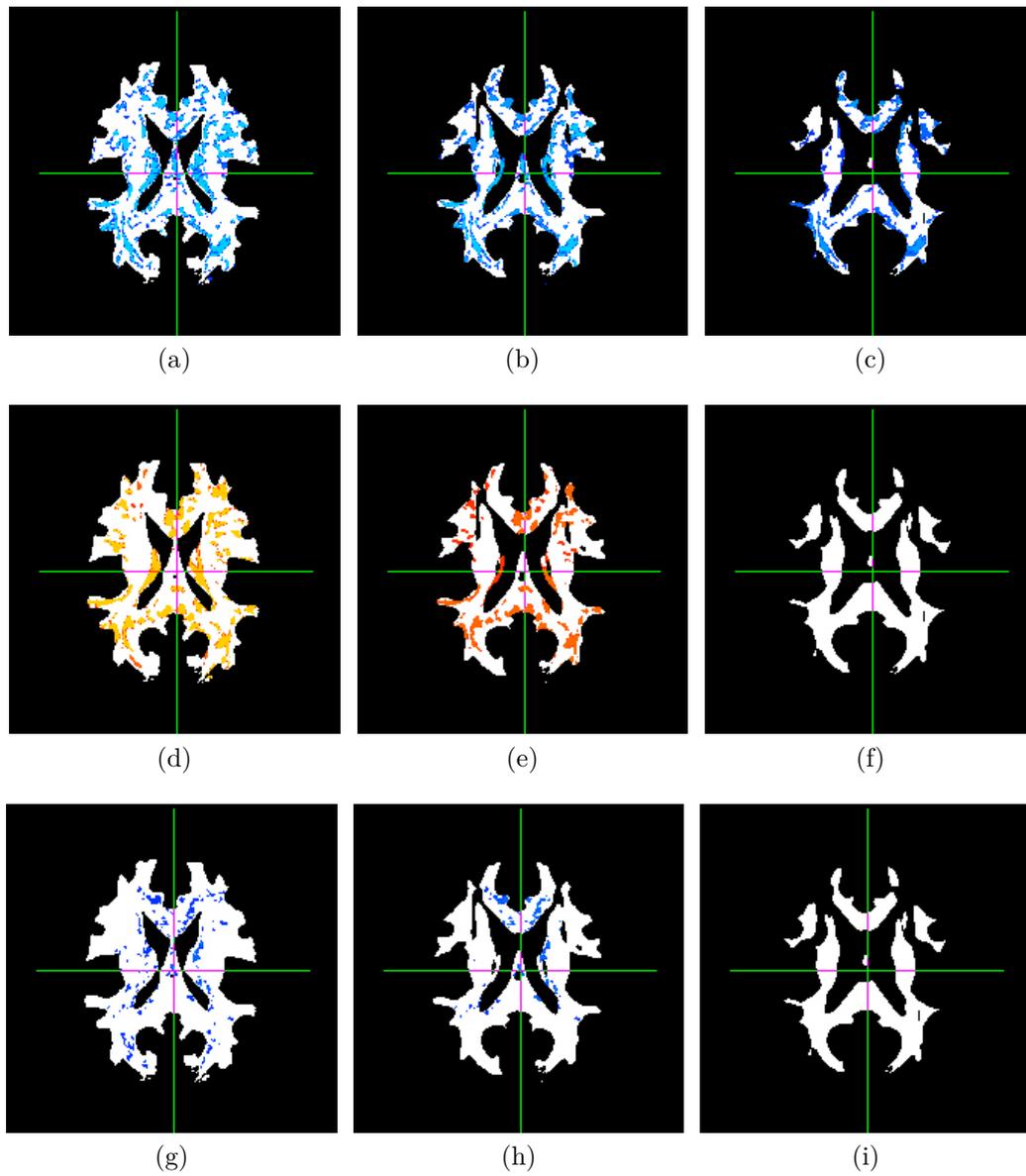


Figura 4.5: Diferencias encontradas con VBM en FA, traza y modo entre los grupos A y D: FA 2000 (a), FA 3000 (b), FA 4000 (c), traza 2000 (d), traza 3000 (e), traza 4000 (f), modo 2000 (g), modo 3000 (h) y modo 4000 (i).

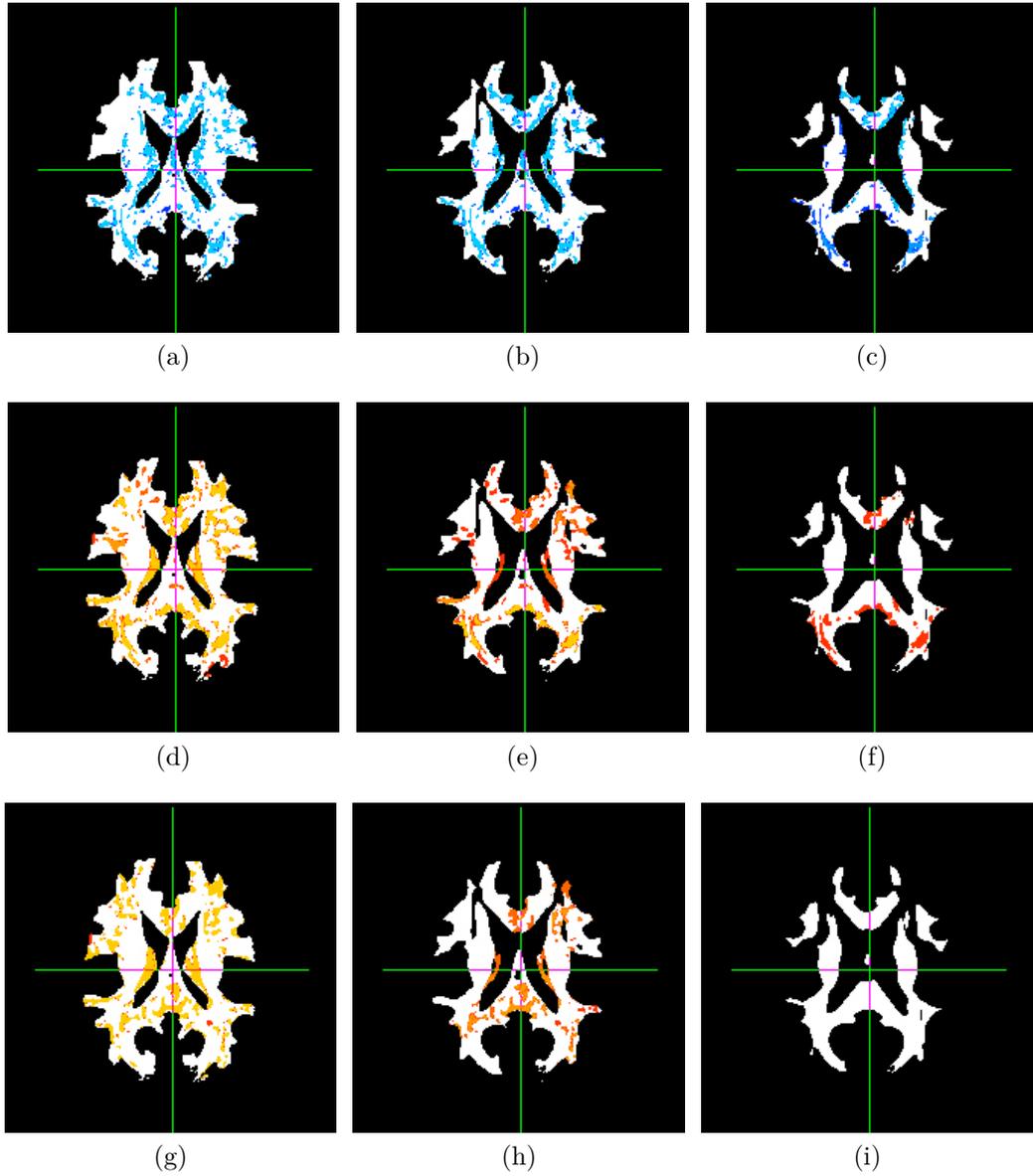


Figura 4.6: Diferencias encontradas con VBM en LM, RD y AD entre los grupos A y D: LM 2000 (a), LM 3000 (b), LM 4000 (c), RD 2000 (d), RD 3000 (e), RD 4000 (f), AD 2000 (g), AD 3000 (h) y AD 4000 (i).

el umbral, menor es ese volumen, y se encuentra más centrado en las zonas con mayor FA de la materia blanca. Al aumentar el umbral las diferencias encontradas se reducen, pero en la mayoría de los casos siguen apareciendo incluso para umbrales altos.

Al igual que sucedía con TBSS, no aparecen diferencias entre los grupos A y E, lo que podría esperarse dadas las halladas entre A y C y entre A y D. Esto se debe probablemente al escaso número de sujetos pertenecientes a ese grupo (solamente uno) para comparar, demasiado limitado como para que el análisis estadístico dé resultados significativos.

En este caso también se han obtenido distintos parámetros cuantitativos a partir de los resultados de las comparaciones. El primero es el número de voxels en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. También se ha calculado el valor medio del *p-value* de todos esos voxels. Por otro lado, se ha obtenido el número de clústeres así como el tamaño medio de todos ellos y el valor medio del *p-value* medio de cada uno.

En las gráficas de las figuras 4.7, 4.8 y 4.9 se muestran estos parámetros para las comparaciones entre los grupos A y C, entre A y D y entre B y C respectivamente, que son aquellos entre los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Las gráficas, en orden descendente, representan los distintos parámetros: número de voxels con diferencias, *p-value* medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y *p-value* medio de los clústeres. El eje X de las gráficas corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Por último, cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

Estos resultados confirman las afirmaciones anteriores acerca de las medidas que presentan mayores diferencias y el efecto del umbral, aunque aparecen unas pequeñas diferencias no apreciadas con la visualización de los resultados, entre los grupos B y C. Además, puede verse como, a medida que aumenta el valor del umbral, el *p-value* tiende, en general, a aumentar. En cuanto a los clústeres, resulta claro que cuantos más hay, menor es su tamaño. Cabe destacar que para valores bajos del umbral, aparece con frecuencia un único clúster, puesto que todos los voxels con diferencias están unidos. Esto hace que, en esos casos, los valores de número de voxels con diferencias y tamaño del clúster sean igual, así como los *p-value* medios, puesto que en realidad se están considerando todos los voxels con diferencias en ambos casos.

En el cuadro 4.1 se muestran, de manera resumida, los grupos entre los

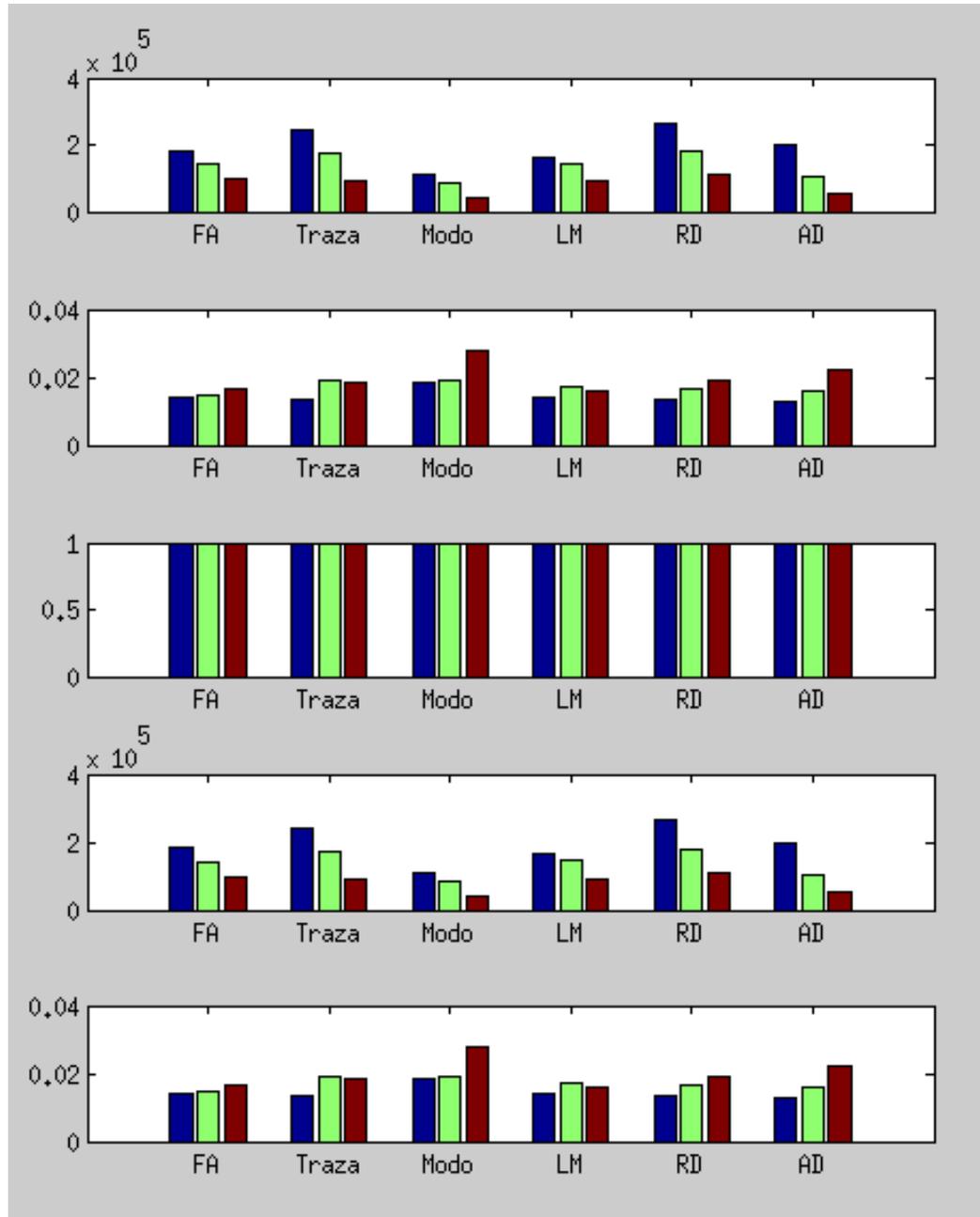


Figura 4.7: Diferencias encontradas con VBM entre los grupos A y C. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

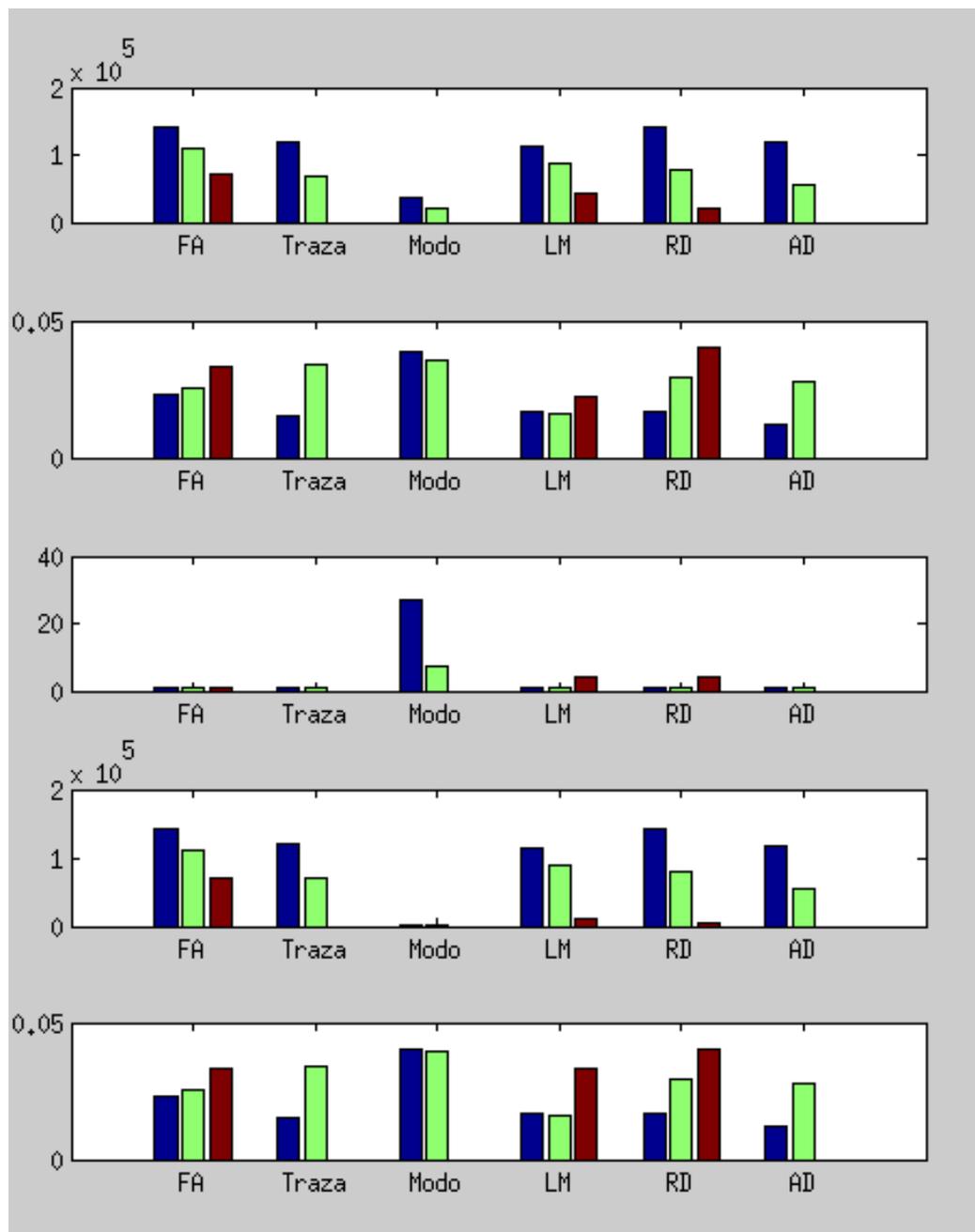


Figura 4.8: Diferencias encontradas con VBM entre los grupos A y D. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

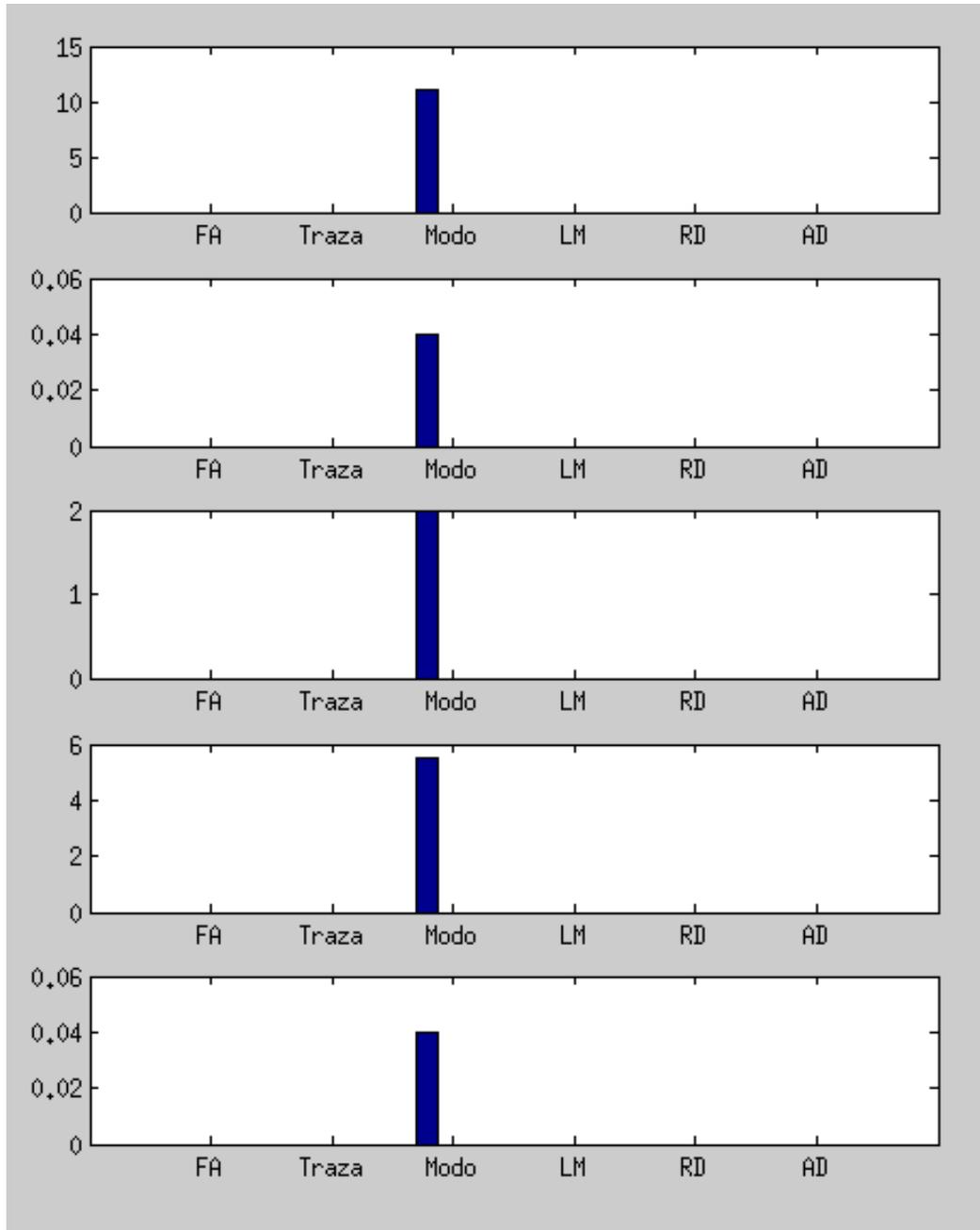


Figura 4.9: Diferencias encontradas con VBM entre los grupos B y C. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un umbral: 2000 (azul), 3000 (verde) y 4000 (rojo).

que se han encontrado diferencias para las distintas medidas estudiadas y los umbrales empleados, así como el número de voxels con diferencias encontrados.

	2000	3000	4000
FA	$A > C$ (183109) $A > D$ (142266)	$A > C$ (142861) $A > D$ (109652)	$A > C$ (98196) $A > D$ (71841)
Traza	$A < C$ (241636) $A < D$ (120546)	$A < C$ (173857) $A < D$ (69180)	$A < C$ (93103)
Modo	$A > C$ (108015) $A > D$ (35803) $B > C$ (11)	$A > C$ (87451) $A > D$ (21524)	$A > C$ (41831)
LM	$A > C$ (164740) $A > D$ (113613)	$A > C$ (145439) $A > D$ (87787)	$A > C$ (89522) $A > D$ (42277)
RD	$A < C$ (263780) $A < D$ (142219)	$A < C$ (179905) $A < D$ (79324)	$A < C$ (111619) $A < D$ (20155)
AD	$A < C$ (197901) $A < D$ (117760)	$A < C$ (104726) $A < D$ (54885)	$A < C$ (50883)

Cuadro 4.1: Diferencias encontradas con VBM

Los datos anteriores han resultado del análisis mediante VBM empleando, sin embargo, la herramienta ideada para TBSS. Es importante señalar que en TBSS no se realiza el suavizado de los datos que, por el contrario, es uno de los pasos de VBM que se lleva a cabo antes del análisis estadístico, como se explicó en la sección 2.3.1. Por tanto, en los datos mostrados anteriormente no se ha realizado este suavizado.

Es por ello que, para completar el análisis, se han llevado a cabo algunas pruebas incluyendo el paso de suavizado con distintos valores del núcleo gaussiano (1mm, 3mm y 5mm) para ver su influencia en los resultados obtenidos. Como ya se comentó, uno de los problemas de VBM consiste en elegir un valor del núcleo gaussiano adecuado, que no distorsione los datos pero que permita mejorar los resultados.

En la figura 4.10 se puede ver una muestra de las imágenes de FA suavizadas con los distintos valores, así como una sin ningún tipo de suavizado. En ella se observa como un valor alto produce imágenes muy filtradas en las que se promedian los valores de bastantes voxels alrededor, mientras que

con valores bajos los voxels promediados son menos y el resultado es más similar al original. En la figura 4.11 se muestra un ejemplo de las diferencias encontradas tras aplicar los distintos valores de suavizado para la FA con un valor de umbral de 2000 y entre los grupos A y C.

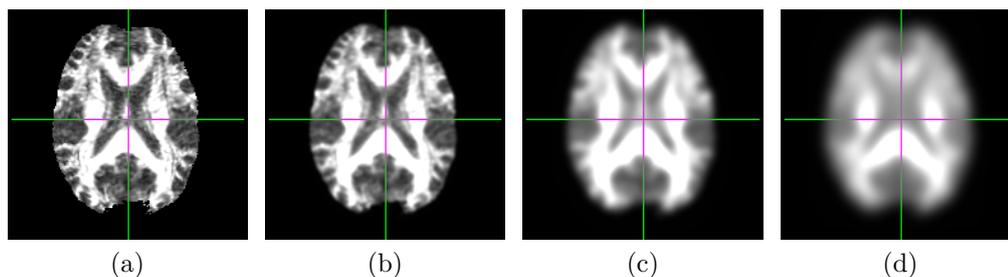


Figura 4.10: Efectos del suavizado sobre la FA con distintos valores de núcleo gaussiano: sin suavizado (a), 1mm (b), 2mm (c) y 3mm (d).

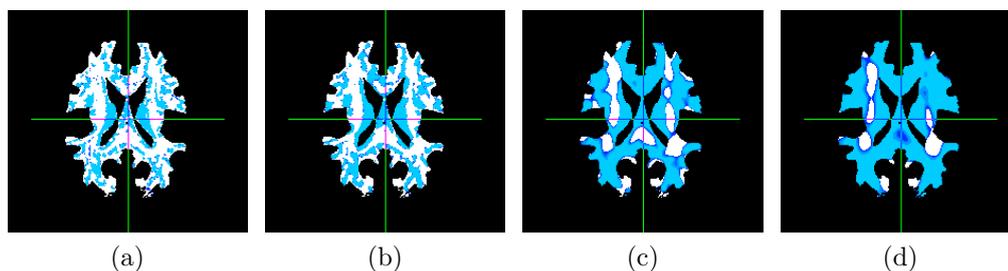


Figura 4.11: Diferencias encontradas en la FA con un umbral de 2000 y en la comparación entre los grupos A y C con distintos valores de núcleo gaussiano: sin suavizado (a), 1mm (b), 2mm (c) y 3mm (d).

Se han calculado los distintos parámetros para la diferentes medidas escalares y los distintos umbrales empleados empleando tres valores distintos de suavizado. En las figuras 4.12 y 4.13 se muestran las gráficas con los valores de la FA para las comparaciones entre los grupos A y C y entre A y D respectivamente. En las figuras 4.14 y 4.15 se muestran las gráficas con los valores de la traza para las mismas comparaciones. Por último, en las figuras 4.16, 4.17 y 4.18 se muestran las gráficas con los valores del modo para las comparaciones entre los grupos A y C, entre A y D y entre B y C. Aunque no se incluyen gráficas para las demás medidas (LM, RD y AD) el comportamiento de éstas al variar el suavizado es similar al de las tres anteriores para las comparaciones entre los grupos A y C y entre A y D. Las

gráficas, en orden descendente, representan los distintos parámetros: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X de las gráficas corresponde a los distintos umbrales empleados: 2000, 3000 y 4000. Por último, cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

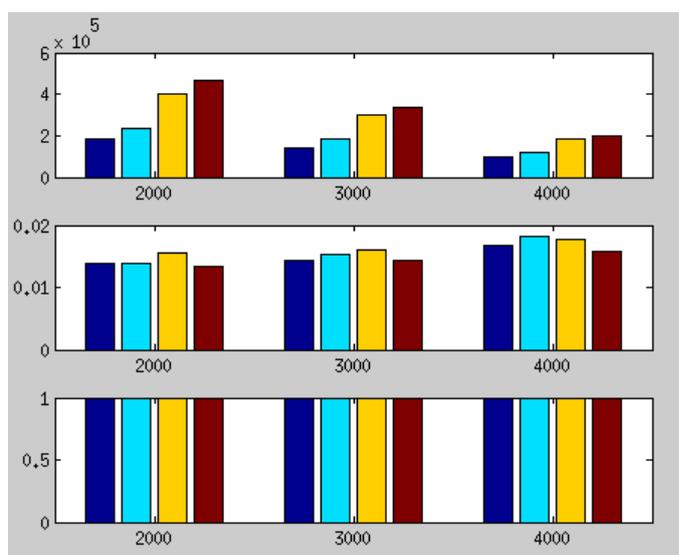


Figura 4.12: Diferencias encontradas para la FA con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

En estas gráficas se puede ver que, en general, el número de voxels encontrados con diferencias aumenta al incrementarse el nivel de suavizado. Esto ocurre cuando dichas diferencias son bastantes y se encuentran repartidas por todo el volumen, llegando incluso a aparecer algunas en casos en los que, sin suavizado, no aparecía ninguna, como en el caso de la traza y el modo entre los grupos A y D con un umbral de 4000. Sin embargo, cuando las diferencias encontradas son pocas y están muy localizadas, como ocurre en el caso del modo entre los grupos B y C, al aumentar el valor del suavizado estas diferencias se diluyen y desaparecen.

En cuanto al p -value tiende en general a disminuir o a mantenerse aproximadamente constante cuando se aumenta el valor del núcleo gaussiano

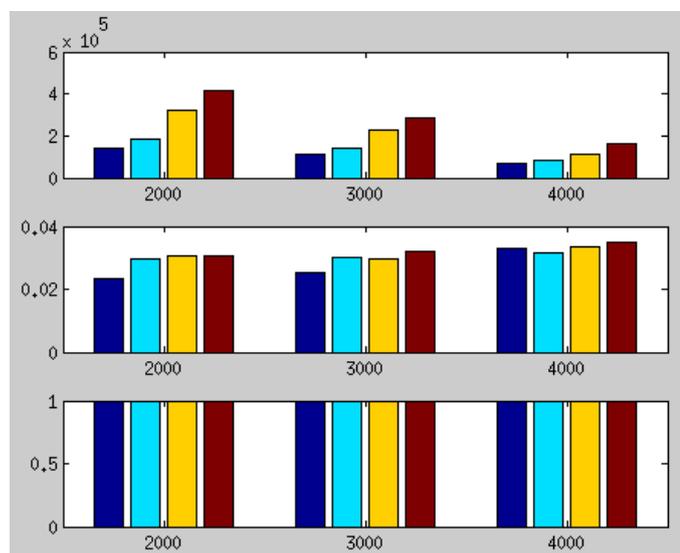


Figura 4.13: Diferencias encontradas para la FA con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

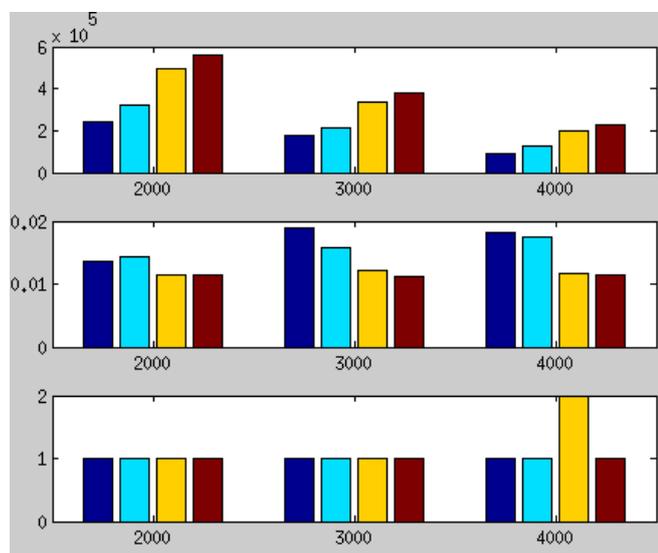


Figura 4.14: Diferencias encontradas para la traza con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

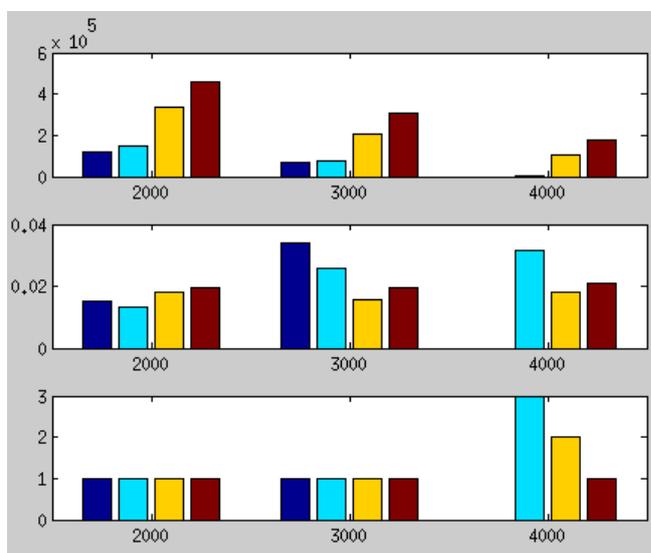


Figura 4.15: Diferencias encontradas para la traza con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

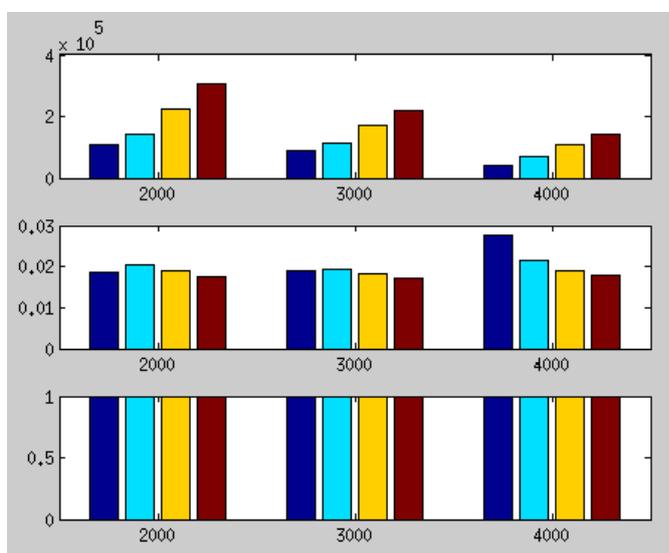


Figura 4.16: Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

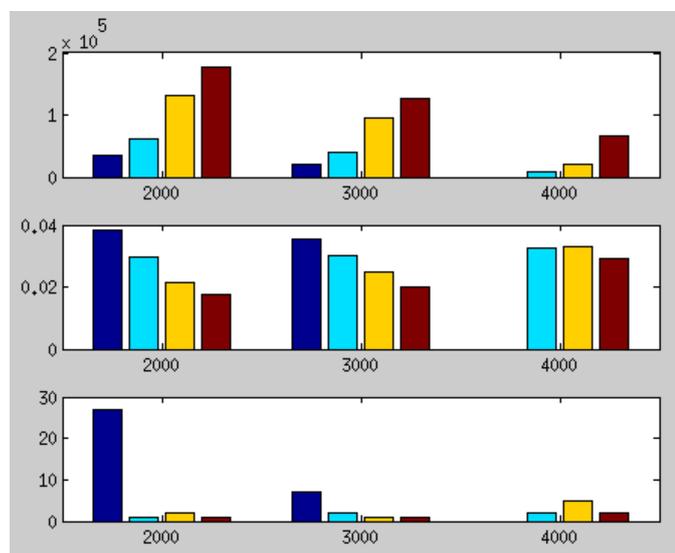


Figura 4.17: Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

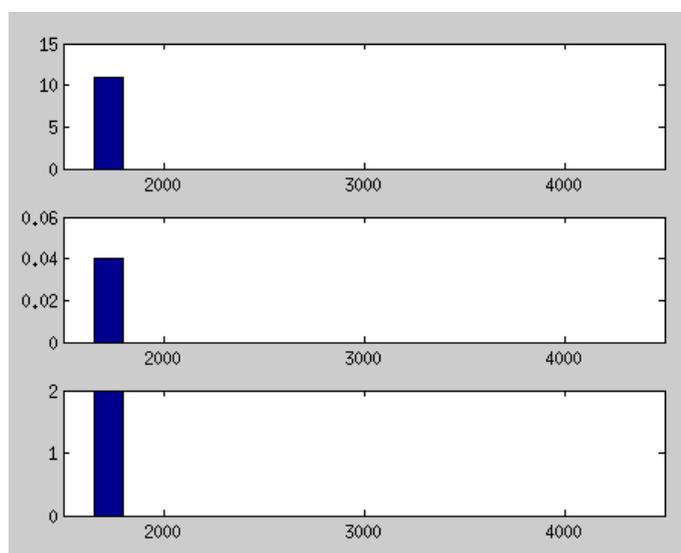


Figura 4.18: Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos B y C empleando distintos suavizados. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos y número de clústeres. El eje X corresponde a los distintos umbrales: 2000, 3000 y 4000. Cada color de las barras indica un suavizado diferente: sin suavizado (azul oscuro), con núcleo de 1mm (azul claro), con núcleo de 3mm (amarillo) y con núcleo de 5mm (rojo).

empleado. Por otro lado, el número de clústeres se mantiene constante en la mayoría de los casos, aunque en otros disminuye (las nuevas diferencias están próximas a las anteriores y unen unos clústeres con otros) o aumenta (las nuevas diferencias están aisladas).

Capítulo 5

Análisis de DTI mediante conectómica

5.1. Proceso

Un análisis por completo distinto a los dos anteriores es el de conectómica, que consiste en calcular medidas de la red neuronal, obteniendo las conexiones entre las distintas regiones de la corteza cerebral.

En la figura 5.1 se muestra un esquema del proceso seguido. En primer lugar, se parte de las imágenes T1 para obtener la segmentación del volumen cerebral y la parcelación de la superficie cortical en distintas regiones (1). Por otro lado, a partir de las imágenes de difusión DWI se procede al cálculo de los haces de fibras mediante la tractografía determinística (2). Juntando la información resultante de los dos pasos anteriores, la tractografía y la parcelación, se obtienen los tractos que unen las distintas regiones (3). Sobre esos tractos de fibras obtenidos pueden calcularse distintas medidas, que dan lugar a matrices de conectividad (4). Finalmente, a partir de las matrices de conectividad de todos los sujetos del estudio, pueden sacarse resultados estadísticos (5).

Durante el análisis completo se emplean tres herramientas *software* distintas: FreeSurfer para la segmentación y parcelación del volumen cerebral a partir de las imágenes T1, Slicer para la tractografía global y la posterior selección de las fibras que conectan las distintas regiones y Matlab para la obtención de las matrices y el análisis estadístico. Para llevar a cabo todo el proceso se ha creado un cuarto *script* (A.4), completamente independiente de los tres *scripts* anteriores de TBSS y VBM, que realiza todos los pasos

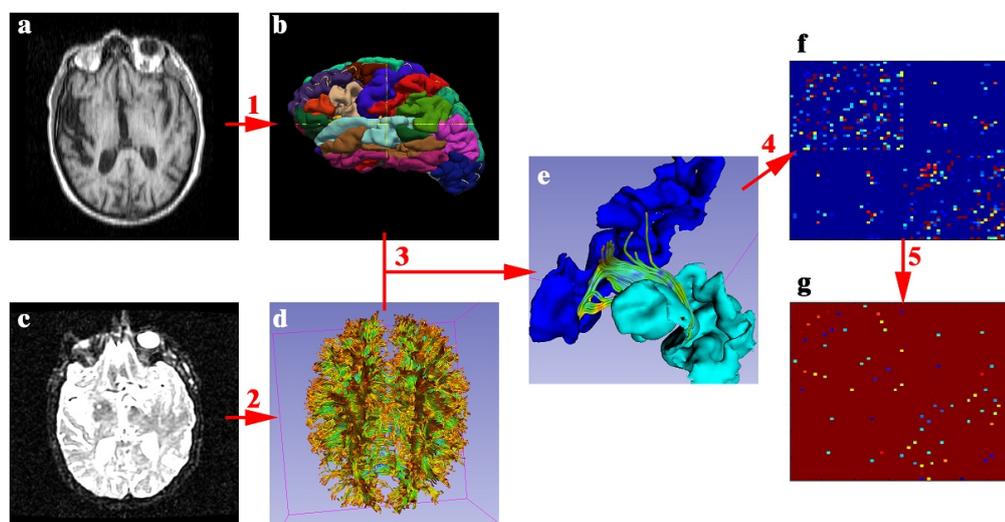


Figura 5.1: Esquema del proceso del análisis mediante conectómica: Imágenes T1 (a), segmentación parcelación de la superficie cortical (b), DWI (c), tractografía global (d), tractografía entre regiones (e), matriz de conectividad (f) y resultados estadísticos (g).

y proporciona una lista de las regiones y conexiones en las cuales existen diferencias entre un par de grupos. Este *script* utiliza a su vez dos *scripts* de Matlab que realizan el cálculo de las medidas de conectividad y el análisis estadístico.

En este tercer análisis se han comparado solo tres de los cinco grupos de pacientes disponibles: controles sanos (A), pacientes con deterioro cognitivo leve (B) y pacientes con enfermedad de Alzheimer leve (C). El motivo es el reducido número de datos disponibles para los otros dos grupos, lo que provoca que los resultados obtenidos para ellos tengan una validez estadística muy limitada.

5.2. Segmentación y parcelación

El primer paso del estudio de conectómica consiste en la segmentación y parcelación a partir de los datos anatómicos de las imágenes de resonancia magnética T1. Para ello se utiliza la herramienta *recon-all* [16] de Freesurfer que reconstruye diferentes superficies y volúmenes cerebrales y los divide en distintas regiones.

Tanto el proceso de segmentación [32] como el de parcelación [33] consisten en la asignación de una etiqueta a cada voxel del volumen cerebral. Estas etiquetas pueden tomar múltiples valores e indican a qué tipo de tejido o región pertenece el voxel. La segmentación divide el cerebro en varias zonas distintas, entre las que se encuentran la materia blanca y la corteza cerebral. La parcelación divide la superficie cortical en 68 regiones distintas, 34 en cada hemisferio. En el anexo B puede verse una lista (cuadro B.1) con las distintas etiquetas de la parcelación y las regiones a las que se refieren.

Partiendo de las imágenes T1 y con la utilización de un atlas, Fresurfer realiza múltiples pasos para llegar a la segmentación y parcelación del volumen cerebral. Primero genera y corrige un único volumen a partir de las múltiples imágenes T1, eliminando el cráneo y el cuello de las mismas así como reduciendo los efectos del movimiento y normalizando la intensidad de las imágenes. A continuación, tras alinear dicho volumen con un atlas propio procede a la segmentación, separando la materia blanca y la materia gris. Después reconstruye diferentes superficies y volúmenes que permiten visualizar y estudiar distintas estructuras cerebrales, como la materia blanca o la corteza cerebral. Un ejemplo de las distintas regiones generadas en la superficie cortical puede verse en la imagen 5.2. Finalmente, realiza la parcelación de la superficie cortical y genera tablas con información sobre las distintas regiones.

5.3. Tractografía

5.3.1. Tractografía global

El cálculo de las fibras de la materia blanca se realiza mediante tractografía determinística con el módulo *TractographyLabelMapSeeding* [13] de Slicer. Este calcula, tras convertir los DWI a formato .nhdr, las fibras que pasan a través de una máscara dada, incluso si se salen de ella. En este caso, puesto que se pretende obtener la tractografía de todo el cerebro, la máscara aplicada abarca toda la materia blanca.

Se han empleado todos los parámetros por defecto a excepción del valor de FA para el que se termina la fibra, que se ha disminuido (de 0,3 que es el valor por defecto a 0,1) con la intención de facilitar que los extremos de las fibras entren en las distintas regiones corticales. El resultado es un conjunto

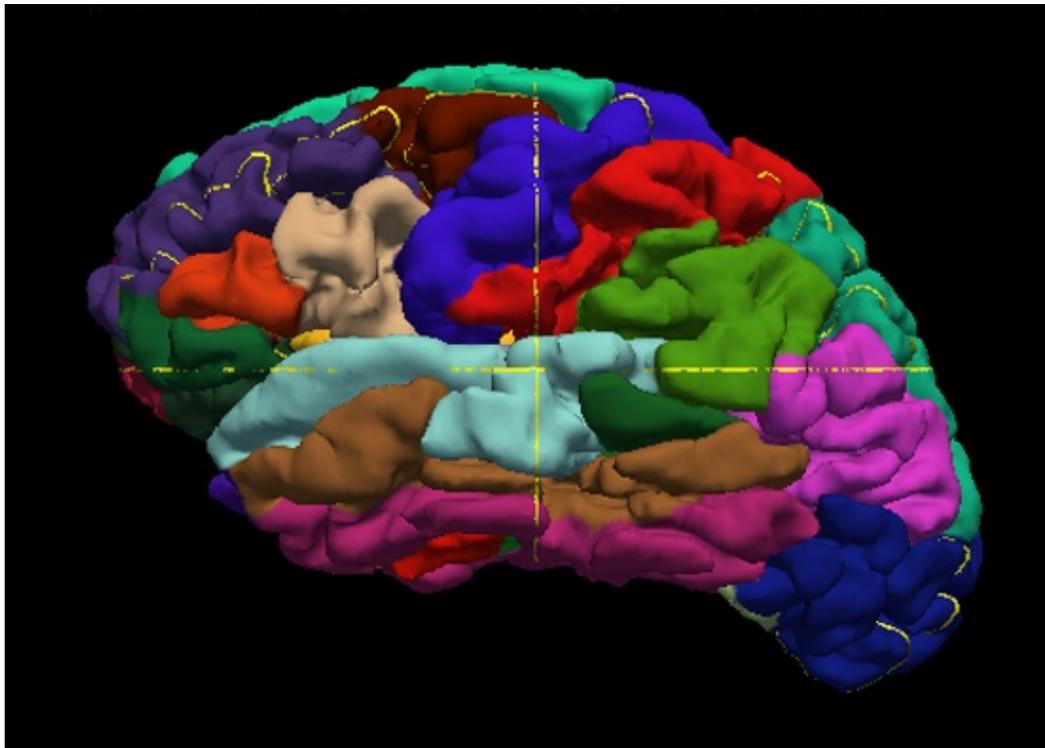


Figura 5.2: Parcelación: regiones de la superficie cortical tras la segmentación y la parcelación realizadas con Freesurfer.

de las fibras estimadas que componen la materia blanca.

En la imagen 5.3 puede verse la tractografía global realizada, y en la imagen 5.4 una muestra de los resultados de los dos procesos anteriores juntos, la parcelación de la superficie cortical (solo del hemisferio derecho) y la tractografía global.

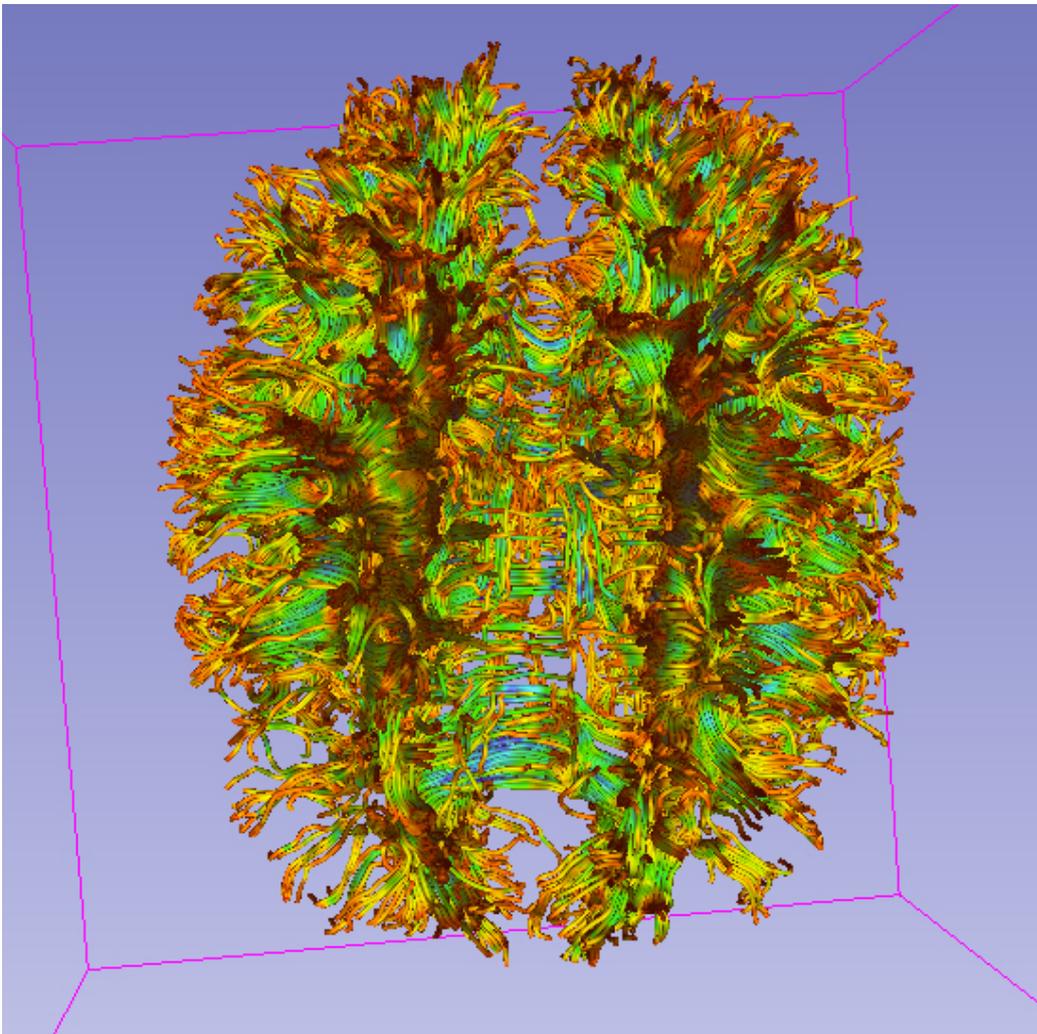


Figura 5.3: Tractografía global: conjunto de fibras de toda la materia blanca obtenidas mediante tractografía determinística con Slicer.

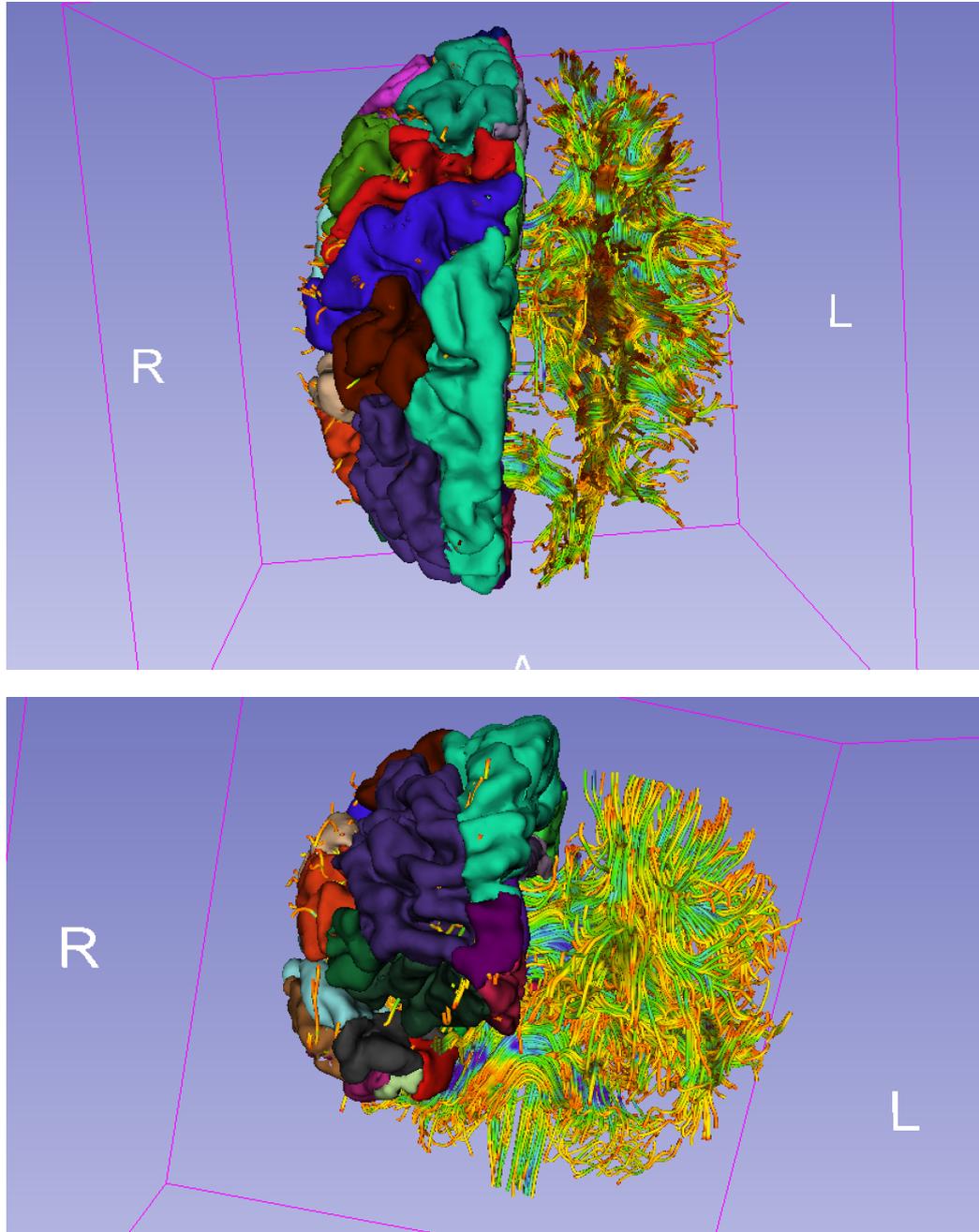


Figura 5.4: Parcelación y tractografía: parcelación de la superficie cortical del hemisferio derecho realizada con FreeSurfer y tractografía global obtenida con Slicer.

5.3.2. Tractografía entre regiones

Una vez obtenida la tractografía global, el módulo *FiberBundleLabelSelect* [13] de Slicer permite seleccionar aquellas fibras que pasan por ciertas regiones determinadas por un mapa de etiquetas. Para ello se utiliza el archivo *aparc+aseg.mgz* creado por Freesurfer y que contiene las etiquetas de la segmentación y la parcelación. Este módulo permite no solo indicar aquellas fibras que pasan por una o varias etiquetas, sino también excluir las que pasan por otras. Aplicando correctamente las etiquetas incluidas y excluidas pueden obtenerse las fibras que conectan una región con otra.

Puesto que se seleccionan todas las fibras que pasan por una región, terminen en ella o solo la atraviesen, una posibilidad para obtener las fibras que conectan dos regiones (terminan y empiezan en ellas), eliminando aquellas que solo las atraviesan, consiste en excluir todas aquellas fibras que pasan por las demás regiones seleccionando aquellas que pasan únicamente por las dos regiones de interés. Sin embargo, algunas fibras que conectan dos regiones atraviesan otras, por lo que de esta manera se estarían eliminando fibras que deberían tenerse en cuenta. Para resolver esto, se excluyen las regiones colindantes a las de origen y destino, permitiendo que atraviesen otras intermedias entre ambas regiones de interés.

Dado que se ha llevado a cabo una tractografía determinística de todo el cerebro, y, por tanto, las fibras serán las mismas tanto si se obtienen las que conectan la región R_i con la región R_j como las que conectan la región R_j con la región R_i . Más adelante, la matriz de conectividad derivada de los resultados de este paso será simétrica y para su cálculo se tendrá en cuenta el mismo subconjunto de fibras tanto para la conexión $R_i - R_j$ como para la conexión $R_j - R_i$.

En la imagen 5.5 pueden verse un par de ejemplo de las fibras que unen dos regiones distintas seleccionadas a partir de la tractografía global y la parcelación.

5.4. Matrices de conectividad

5.4.1. Medidas de conectividad

Una vez obtenidas las tractografías parciales entre las distintas regiones se pueden calcular distintas medidas, que dan lugar a matrices de conectividad.

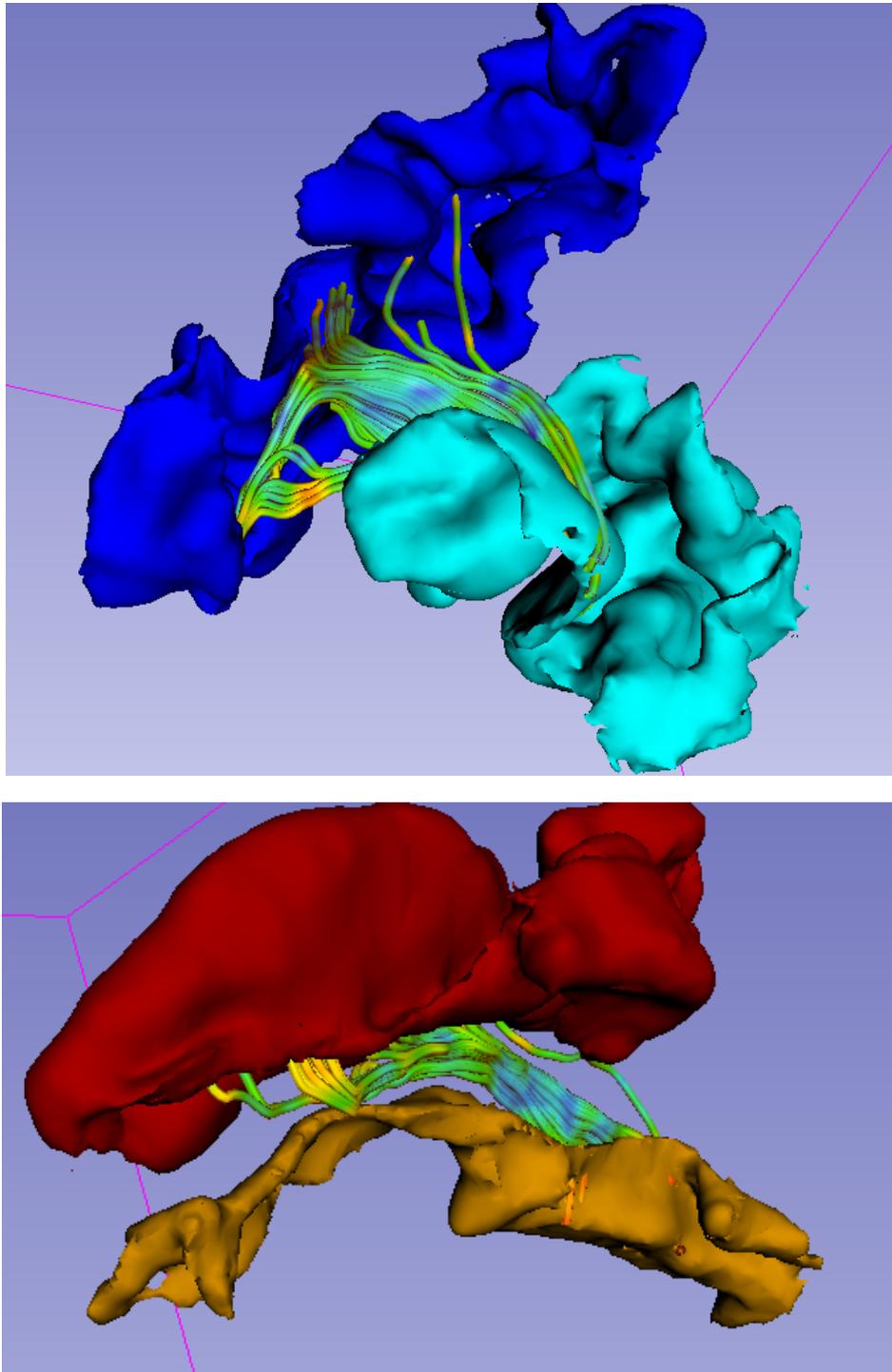


Figura 5.5: Tractografía entre regiones: fibras que conectan cada par de regiones seleccionadas a partir de la tractografía global y la parcelación.

Estas matrices caracterizan las conexiones entre cada par de regiones. Puesto que se ha utilizado tractografía determinista, que no depende de la dirección en la que se calculan las fibras, las matrices son simétricas: la medida es la misma si se toman las conexiones que van de la región R_i a la región R_j que si se toman las que van de la región R_j a la región R_i .

Se han realizado tres medidas distintas:

- Número de fibras (f_{ij}): Indica el número de fibras que conectan las regiones R_i y R_j .
- FA media (fa_{ij}): Indica la FA media de todas las fibras que conectan las regiones R_i y R_j . Es la suma de la FA en cada punto de las fibras que conectan ambas regiones dividida entre el total de puntos que forman dichas fibras.
- Distancia mínima (d_{ij}): Indica la longitud (número de puntos que la forman) de la fibra más corta de las que unen las regiones R_i y R_j .

En la imagen 5.6 se muestra un ejemplo de las distintas matrices de conectividad correspondientes a cada una de estas medidas. En ellas, tanto el eje X como el eje Y representan las distintas regiones. En estas matrices puede verse claramente que las conexiones entre las regiones de un mismo hemisferio (cuadrantes superior izquierdo e inferior derecho) son mayores que las conexiones entre regiones de distintos hemisferios (cuadrantes superior derecho e inferior izquierdo). La diagonal principal representa las conexiones de cada región consigo misma y su valor es siempre nulo.

5.4.2. Parámetros de conectividad

A partir de las matrices anteriores pueden calcularse distintos parámetros para cada región [27]. En las siguientes ecuaciones N es el número total de regiones. Para evitar indeterminaciones a la hora de calcular estos parámetros en regiones poco conectadas, el valor de algunos de ellos se iguala a 0 cuando no existen fibras que conectan la región R_i con ninguna otra o cuando está solo se conecta con otra región.

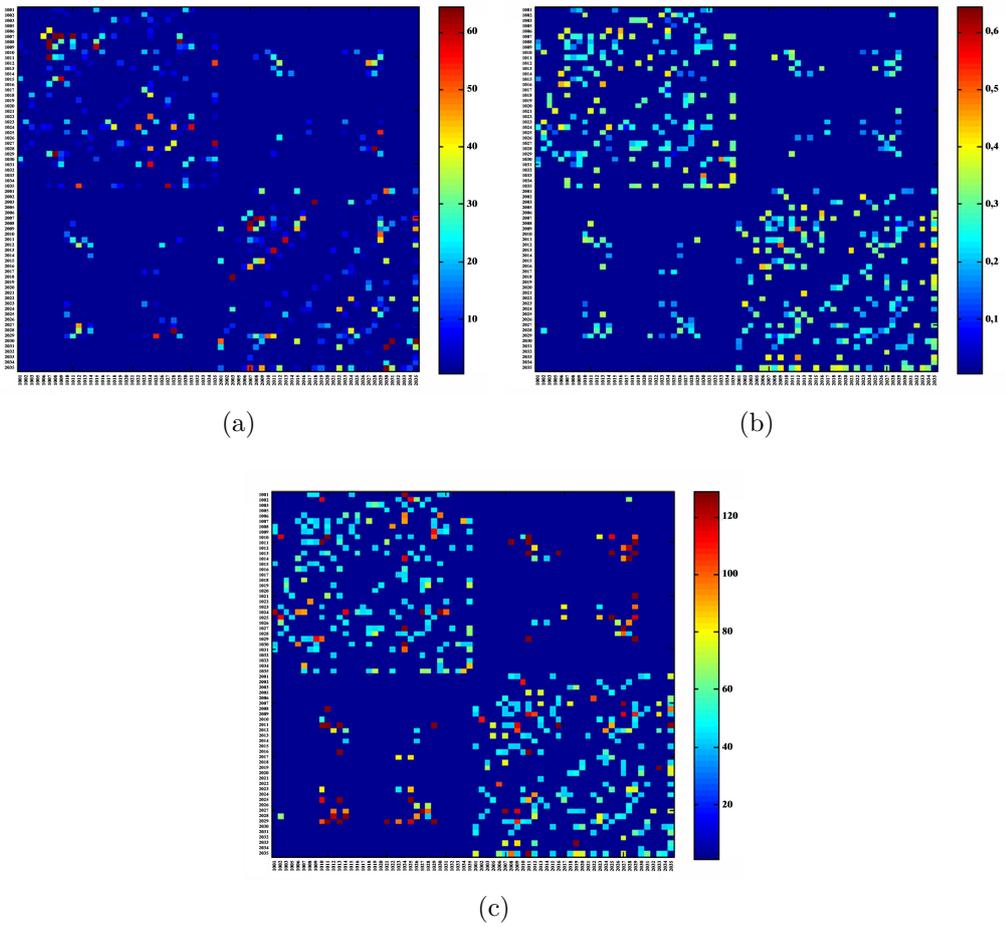


Figura 5.6: Matrices de conectividad: número de fibras (a), FA media (b) y distancia mínima (c). Tanto el eje X como el eje Y representan las distintas regiones.

- Regiones conectadas: Indica el número de regiones con las que se conecta cada región R_i .

$$RC_i = \sum_{j=1}^N a_{ij} \quad (5.1)$$

$$\text{Siendo } a_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{si } f_{ij} > 0 \\ 0 & \text{si } f_{ij} = 0 \end{cases}$$

- Fibras por región: Indica el número de fibras que conectan la región R_i con otras regiones.

$$F_i = \sum_{j=1}^N f_{ij} \quad (5.2)$$

- FA por región: Es la suma de la FA media de todas las fibras que conectan la región R_i con otras regiones.

$$FA_i = \sum_{j=1}^N f a_{ij} \quad (5.3)$$

- Longitud mínima media: Es el valor medio de las distancias mínimas de las conexiones entre la región R_i y otras.

$$L_i = \begin{cases} \frac{1}{RC_i} \sum_{j=1}^N d_{ij} & \text{si } RC_i > 0 \\ 0 & \text{si } RC_i = 0 \end{cases} \quad (5.4)$$

- Coeficiente de agrupación: Representa la interconectividad de las regiones vecinas a la región R_i .

$$C_i = \begin{cases} \frac{1}{RC_i(RC_i-1)} \sum_{h=1}^N \sum_{j=1}^N (f_{ij} f_{ih} f_{jh})^{1/3} & \text{si } RC_i > 1 \\ 0 & \text{si } RC_i \leq 1 \end{cases} \quad (5.5)$$

Tras aplicar estas ecuaciones a todas las regiones se obtiene un vector para cada parámetro, siendo cada elemento de ese vector el valor del parámetro en cada una de las regiones corticales. Si se representan todos los vectores de cada parámetro obtenidos para los distintos sujetos del estudio en una misma gráfica se obtienen matrices como las de la figura 5.7. En algunas de estas gráficas se diferencian fácilmente las regiones que tienen, en general, mayor número de conexiones de las que tienen menos.

5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos resultantes de las matrices de conectividad y los parámetros de conectividad se realiza con Matlab. Para ello se emplearon dos funciones de comparación entre distintos grupos, anova [14] y t-test [18]. La primera compara distintos datos agrupados en dos o más grupos y proporciona el valor del *p-value*, indicando si los valores comparados pertenecen o no a una distribución gaussiana única. El segundo realiza una comparación similar pero solamente entre dos grupos, proporcionando, de nuevo, el valor del *p-value*. Para cada medida a comparar se aplica primero anova a los tres grupos simultáneamente para después, en aquellas medidas en las que aparecen diferencias estadísticamente significativas, aplicar t-test entre cada pareja de grupos (A-B, A-C y B-C).

Las distintas medidas comparadas son las siguientes:

- Conexiones (68 x 68 para cada medida y cada paciente): Los tres valores obtenidos para cada conexión $R_i - R_j$ (número de fibras, FA media y distancia mínima).
- Regiones (68 para cada parámetro y cada paciente): Los parámetros calculados para cada región R_i (regiones conectadas, fibras por región, FA por región, longitud mínima media y coeficiente de agrupación)
- Valores medios (1 para cada parámetro y cada paciente): Valor medio para cada sujeto del estudio de los parámetros de conectividad. Es la suma de todas las componentes de cada vector dividido entre el número total de regiones.

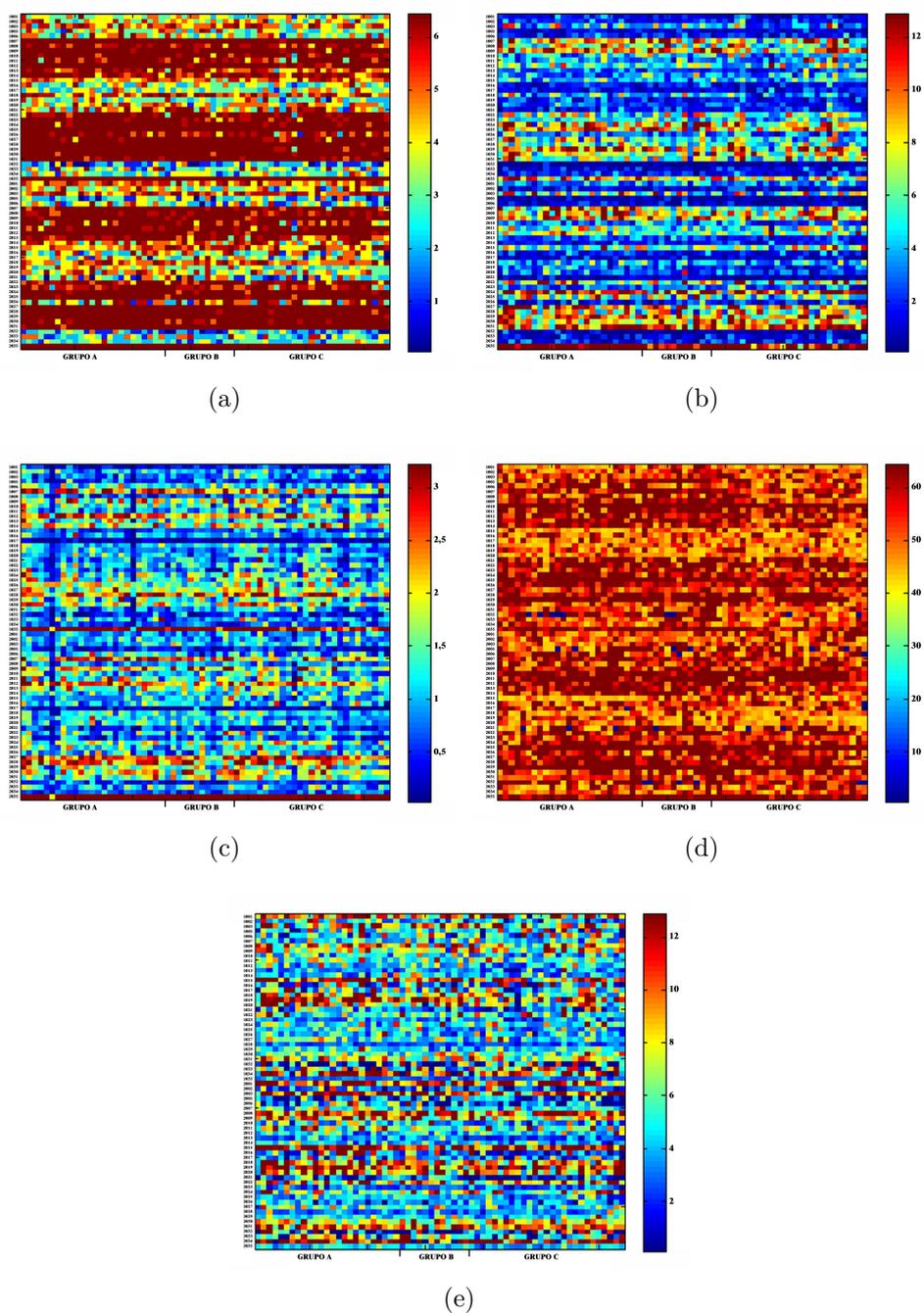


Figura 5.7: Matrices de parámetros de conectividad: regiones conectadas (a), fibras por región (b), FA por región (c), longitud mínima media (d) y coeficiente de agrupación (e). El eje X representa los distintos sujetos del estudio y el eje Y las distintas regiones.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de analizar los *p-value* obtenidos es la corrección por comparaciones múltiples. Se ha empleado la corrección de Bonferroni para disminuir el valor del *p-value* para el cual se considera que existen diferencias estadísticamente significativas. Según la corrección de Bonferroni, el nuevo valor del umbral del *p-value* ($p_{comparación}$) viene dado por la expresión 5.6:

$$p_{comparación} = \frac{p_{general}}{n_{comparaciones}} \quad (5.6)$$

Siendo $p_{general}$ el umbral de 0,05 y $n_{comparaciones}$ el número de comparaciones distintas realizadas.

Aplicando esta corrección, los valores del umbral del *p-value* utilizado para las distintas medidas a comparar son los que aparecen en el cuadro 5.1:

	Anova	T-test
Conexiones	$0,05/(68 \cdot 68) = 1,08 \cdot 10^{-5}$	$0,05/(3 \cdot 68 \cdot 68) = 3,60 \cdot 10^{-6}$
Regiones	$0,05/68 = 7,35 \cdot 10^{-4}$	$0,05/(3 \cdot 68) = 2,45 \cdot 10^{-4}$
Valores medios	0,05	$0,05/3 = 1,67 \cdot 10^{-2}$

Cuadro 5.1: Umbrales corregidos del *p-value* para las distintas medidas de conectividad tras aplicar la corrección de Bonferroni

5.6. Resultados

Tras aplicar los umbrales corregidos indicados en el cuadro 5.1 a los *p-value* calculados a partir de las matrices de conectividad y los parámetros de conectividad se obtienen varias diferencias en algunas de las medidas entre dos de los grupos de sujetos. Más concretamente, en los cuadros 5.2 y 5.3 se pueden ver aquellas medidas para las que se cumple la condición del *p-value* para anova y para t-test respectivamente.

No aparecen diferencias significativas en las medidas realizadas sobre las conexiones entre dos regiones. Sin embargo, en los valores calculados para cada región aparecen diferencias con anova en 3 regiones: 1013 (regiones conectadas), 2019 (regiones conectadas y FA por región) y 2015 (longitud mínima media). Las dos primeras son confirmadas con t-test entre los grupos

Medida	Región	<i>p-value</i>
Regiones conectadas	1013	0,00049407
	2019	0,00023166
FA por region	2019	0,00065317
Longitud mínima media	2015	0,00039677
Valor medio: Regiones conectadas		0,0027917
Valor medio: Longitud minima media		0,011635

Cuadro 5.2: Diferencias encontradas mediante el análisis de conectómica con anova

Medida	Región	<i>p-value</i>		
		A-B	A-C	B-C
Regiones conectadas	1013		0,00014589	
	2019		$3,8384e - 05$	
FA por region	2019		0,00024508	
Valor medio: Regiones conectadas			0,0010238	
Valor medio: Longitud minima media				0,0046244

Cuadro 5.3: Diferencias encontradas mediante el análisis de conectómica con t-test

A y C, aunque no ocurre lo mismo con la última. En cuanto a los valores medios, anova indica que existen diferencias entre grupos en las medidas de regiones conectadas y longitud mínima media, y t-test muestra entre qué dos grupos existen esas diferencias: regiones conectadas entre A y C, y longitud mínima media entre B y C.

Capítulo 6

Comparación de los procedimientos de análisis empleados y sus resultados

A lo largo del estudio se han empleado tres métodos distintos para el análisis de resonancia magnética de difusión. Los dos primeros, TBSS y VBM presentan características parecidas y los resultados obtenidos con ellos no difieren mucho y son fáciles de comparar entre sí. El tercer procedimiento, análisis de conectividad, es bastante distinto y por tanto sus características y los resultados obtenidos son diferentes.

Mientras que con VBM se realiza una comparación voxel a voxel de toda o gran parte de la materia blanca, con TBSS solo se realiza esa comparación sobre un esqueleto de la misma. Esto lleva a que los resultados obtenidos con TBSS sean menores y dependan en mayor medida del umbral empleado en el esqueleto. Sin embargo, el proceso de esqueletonización de las imágenes en TBSS ayuda a garantizar con mayor seguridad que se están comparando voxels pertenecientes a las mismas regiones de los distintos sujetos, mientras que en VBM existe la incertidumbre de si el registro realizado ha sido correcto o por el contrario se están comparando voxels de distintas regiones.

También, como se ha comprobado, la realización de un suavizado de los datos en VBM antes del análisis estadístico afecta a los resultados del mismo. Aunque es un paso pensado para mejorar los efectos de la inexactitud de la normalización realizada y hacer que los datos presenten una distribución más gaussiana, el valor del núcleo gaussiano utilizado debe elegirse con cuidado. Un valor demasiado elevado puede filtrar las imágenes haciendo que se comparen voxels donde se ha promediado el valor de muchos otros alrede-

dor, afectando a los resultados obtenidos. Esto es un problema de VBM que en TBSS no se presenta, ya que no es necesario corregir de esta manera el registrado porque de ello se encarga la eskeletonización.

Los umbrales empleados tanto en VBM como en TBSS (2000, 3000 y 4000) restringen la cantidad de voxels que se comparan. En el primero el umbral establece el valor mínimo de FA que se utiliza para crear la máscara. En el segundo el umbral establece, una vez creado el esqueleto con los valores medios de la FA, el valor mínimo de FA de los voxels pertenecientes al esqueleto que se utilizan. En ambos casos un aumento del valor del umbral conlleva que los voxels seleccionados sean menos y se encuentran más alejados de los bordes de la sustancia blanca.

En las figuras 6.1, 6.2 y 6.3 se pueden ver los distintos parámetros calculados para cada medida a partir de los resultados de TBSS (en azul) y de VBM sin suavizado realizado (en rojo) con cada umbral (2000, 3000 y 4000) para la comparación entre los grupos A y C. En ellas se puede ver que, como ya se ha dicho, en VBM aparecen muchos más voxels con diferencias, puesto que se están comparando también muchos más. Además, el efecto del umbral afecta de manera similar al número de voxels con diferencias en ambos métodos. El número de clústeres tiende a ser bastante mayor en los resultados de TBSS, y, por tanto, su tamaño menor.

En cuanto a los *p-values* son, en general, mayores en TBSS que en VBM, tanto considerando el global de los voxels con diferencias como los valores medios en los clústeres. Esta diferencia se acentúa cuando el umbral aumenta.

Una diferencia importante a tener en cuenta entre ambos métodos es el tiempo que tardan en procesar la información (varias horas para cada análisis completo). Como se ha utilizado la misma herramienta para los dos procesos, los pasos comunes requieren del mismo tiempo, que es de varios minutos. El paso de eskeletonización, que se realiza en TBSS pero no en VBM no requiere de mucho tiempo (unos minutos). Donde se encuentra la mayor carga computacional, y también donde radica la mayor diferencia entre ambos métodos, es en el análisis estadístico de los datos. Las principales variables que influyen en el tiempo requerido por esta parte del análisis son el número de voxels a comparar (menor cuanto mayor es el umbral), el número de permutaciones realizadas (establecido al ejecutar el comando *randomise*), las cantidad de medidas comparadas y el número de grupos y comparaciones entre ellos. Puesto que los grupos comparados y las medidas han sido las mismas en ambos análisis, la diferencia en el tiempo de ejecución radica en los

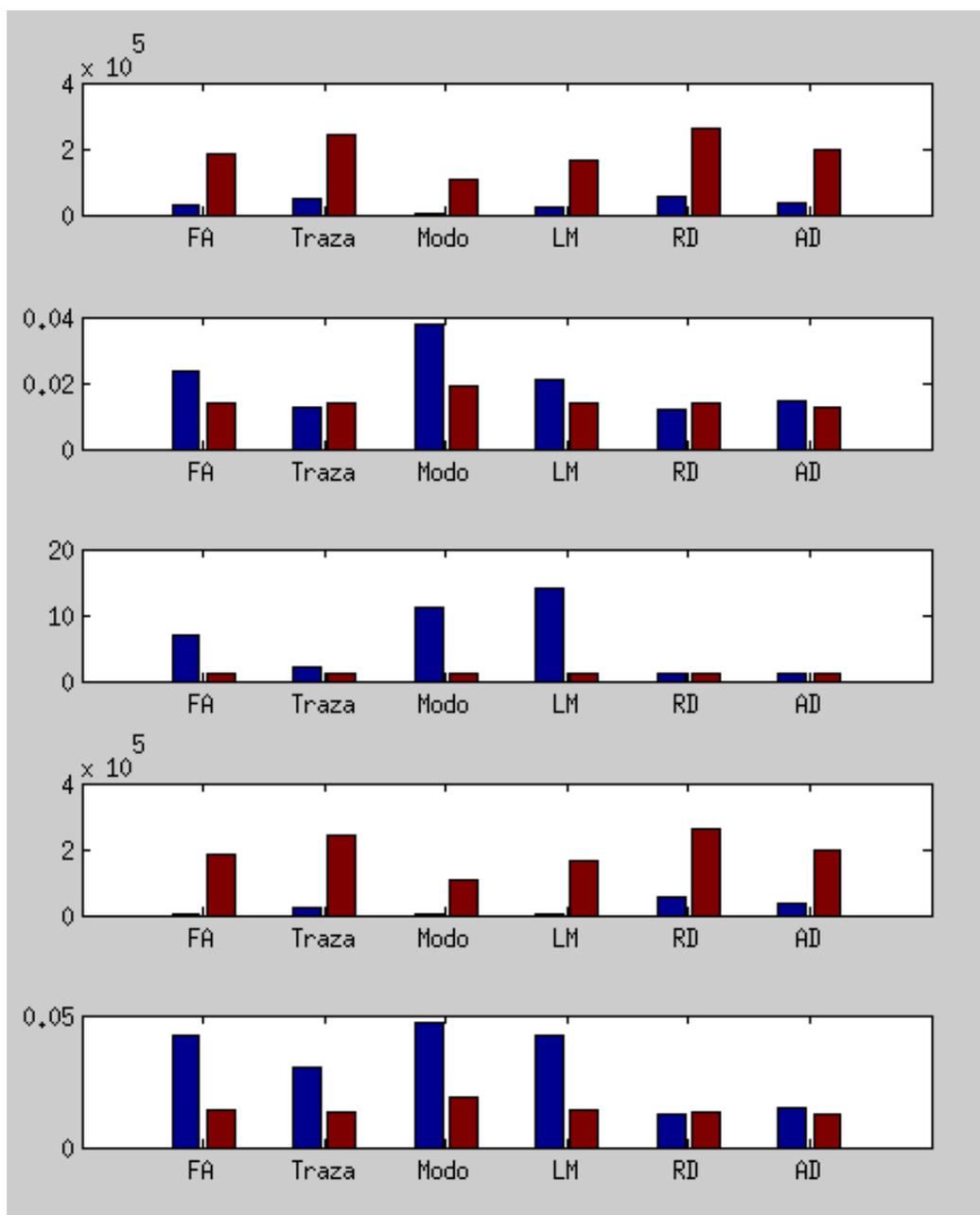


Figura 6.1: Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 2000. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un método de análisis: TBSS (azul) y VBM (rojo).

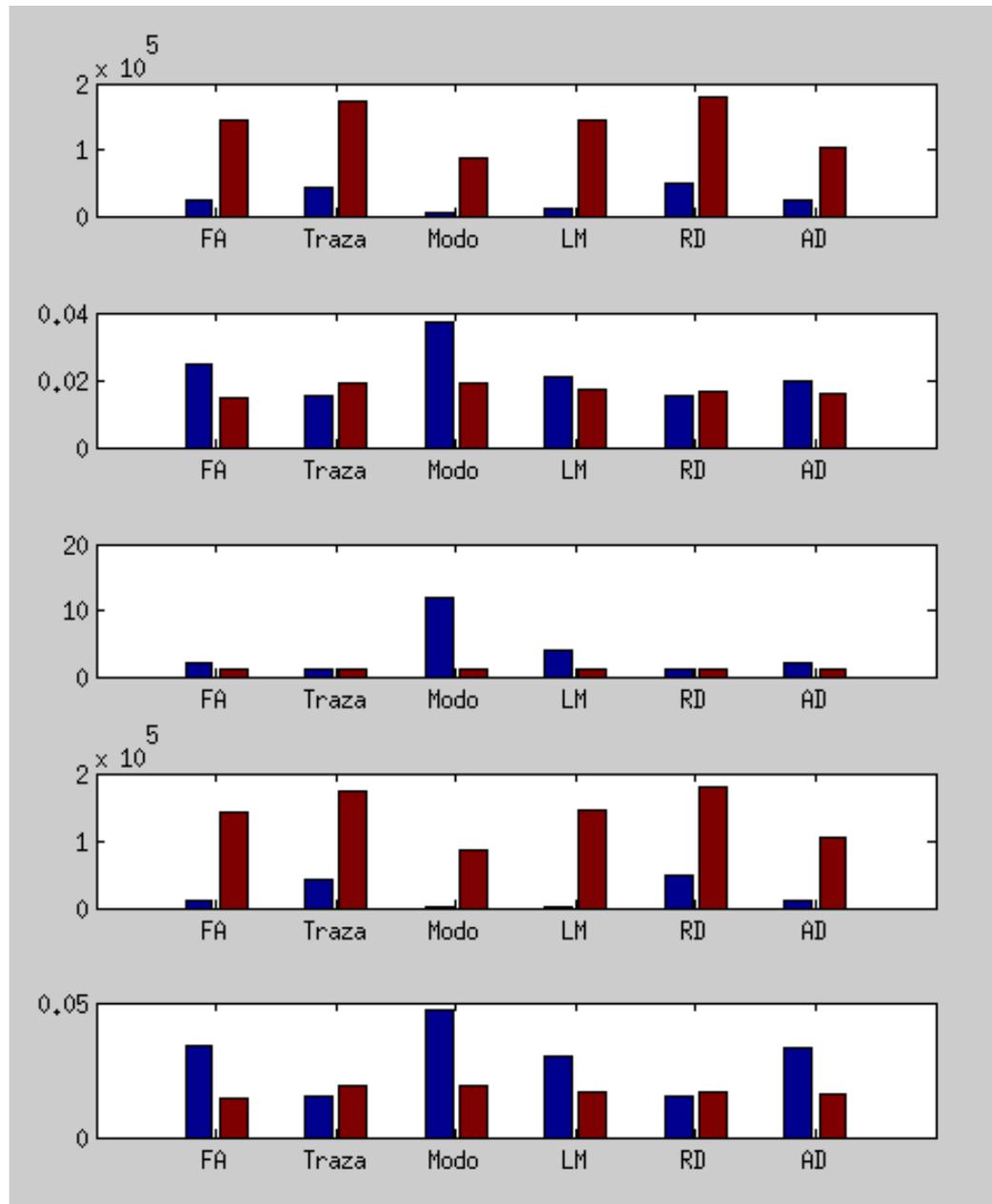


Figura 6.2: Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 3000. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, *p-value* medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y *p-value* medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un método de análisis: TBSS (azul) y VBM (rojo).

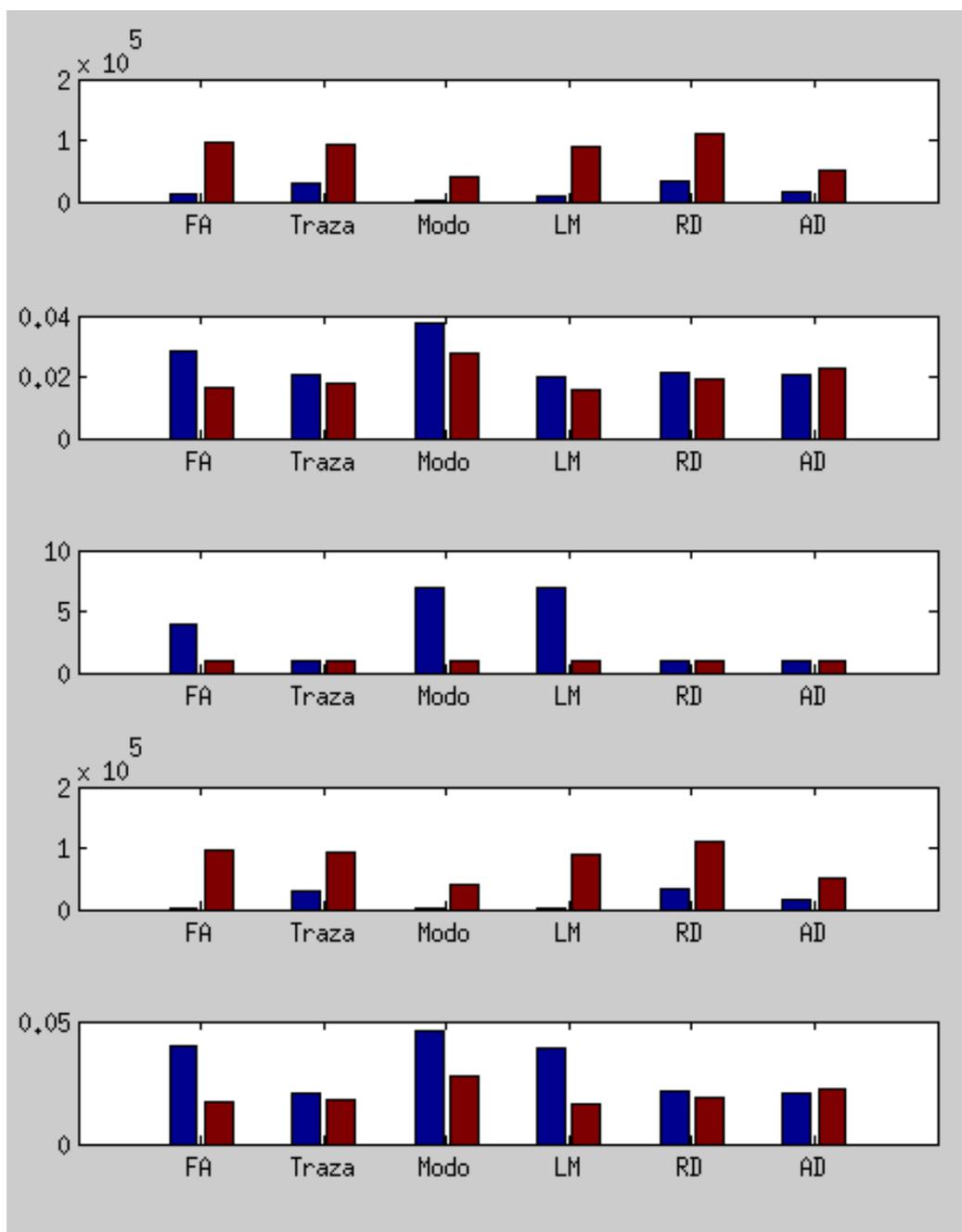


Figura 6.3: Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 4000. Las gráficas, en orden descendente, representan: número de voxels con diferencias, p -value medio en ellos, número de clústeres, tamaño medio de los clústeres y p -value medio de los clústeres. El eje X corresponde a las distintas medidas: FA, traza, modo, LM, RD y AD. Cada color de las barras indica un método de análisis: TBSS (azul) y VBM (rojo).

voxels comparados, que en VBM es mucho mayor que en TBSS. Aun cuando se ha reducido diez veces el número de permutaciones en VBM (100) respecto a TBSS (1000) éste ha llevado más tiempo (varias horas de diferencia).

El análisis de conectómica, en comparación con los anteriores, requiere de una carga computacional y un tiempo mucho mayor. Esto se debe principalmente al proceso de segmentación y parcelación, que requiere de varias horas para cada sujeto del estudio.

Otra gran diferencia a la hora de realizar los distintos análisis con los métodos de VBM y TBSS respecto al de conectómica radica en la mayor o menor variabilidad del método y su implementación. Mientras que los dos primeros se llevan a cabo con un único *software*, salvo el procesado previo, que implementa las herramientas necesarias con una estructura clara y prefijada y con pocos parámetros que se puedan modificar, para realizar el tercero se emplean tres *softwares* distintos (y podrían haberse empleado otros distintos) con gran cantidad de opciones. En el análisis de conectividad la mayoría de los pasos presentan una gran variedad de formas de llevarse a cabo. En primer lugar, no existe un número claro de regiones en las que dividir la superficie cortical. Por otro lado, empleando un algoritmo probabilístico para la tractografía, en lugar de determinístico, las fibras obtenidas varían, dependiendo además de la dirección en la que se obtengan (no sería lo mismo ir de la región R_i a la R_j que a la inversa). Finalmente, para seleccionar las fibras que unen dos regiones distintas pueden utilizarse distintos métodos: hacer la tractografía global y luego seleccionar las fibras que pasan por las regiones deseadas o bien hacer la tractografía para cada región.

Los resultados obtenidos tanto con VBM como con TBSS muestran las diferencias halladas en todo el volumen de materia blanca, y, en general, aparecen repartidas por todo él. Es fácil comparar ambos resultados sin más que visualizar simultáneamente los mismos. Por otro lado, los resultados obtenidos con el análisis de conectómica muestran diferencias encontradas en varias regiones aisladas. Resulta difícil relacionar los resultados alcanzados con este análisis con los dos previos, no solo por haberse obtenido mediante *softwares* diferentes sino también por la concepción distinta en la que se basan.

Finalmente, hay que señalar las similitudes y diferencias entre los tres métodos en lo referente a los resultados obtenidos entre los distintos grupos. Con los tres procedimientos utilizados se han encontrado diferencias entre los grupos A y C. Empleando TBSS y VBM también han aparecido entre los grupos A y D, que con conectómica no se han comparado debido al reducido

número de sujetos del grupo D. Las pequeñas diferencias encontradas con VBM entre los grupos B y C también aparecen mediante conectómica, mientras que con TBSS no se aprecian. En el cuadro 6.1 se resumen los grupos entre los que se han encontrado diferencias con cada uno de los tres métodos utilizados.

VBM	A - C	A - D	B - C
TBSS	A - C	A - D	
Conectómica	A - C		B - C

Cuadro 6.1: Diferencias encontradas con los distintos métodos de análisis

Capítulo 7

Conclusiones y líneas de trabajo futuro

7.1. Conclusiones

En el estudio realizado se han llevado a cabo tres procedimientos distintos de análisis de imágenes de resonancia magnética de difusión sobre datos de varios sujetos, algunos de ellos controles sanos y otros pacientes con distintos grados de enfermedad de Alzheimer. De esta manera se ha cumplido el doble objetivo de buscar diferencias que caractericen la enfermedad a lo largo de su desarrollo y, a la vez, comparar varios métodos de análisis.

En lo referente a las diferencias entre los distintos grupos de sujetos se han encontrado diversas diferencias estadísticamente significativas para cada análisis. Con VBM se han estudiado seis medidas escalares derivadas de los tensores, hallando diferencias para todas ellas entre los controles sanos y los pacientes con enfermedad de Alzheimer leve y moderada, repartidas por todo el volumen cerebral. Con TBSS los resultados han sido parecidos aunque entre los grupos de controles sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer moderada han sido menores y no se han obtenido para todas las medidas. Además, se ha visto como, si bien el valor del umbral empleado ayuda a delimitar la zona analizada, un valor demasiado alto hace que los posibles resultados no aparezcan. También se ha estudiado como afecta el valor del núcleo gaussiano utilizado para el suavizado en VBM, el cual, si es demasiado alto, puede variar bastante los resultados obtenidos. Por otro lado, con el análisis de conectividad se han encontrado diferencias en las medidas de conectividad de varias regiones aisladas.

En cuanto a los tres métodos estudiados, se han descrito los distintos pasos de los que constan y se han comparado en distintos aspectos. VBM y TBSS, por ser más similares entre sí, presentan ciertas características comunes, y se han descrito las principales ventajas e inconvenientes de cada uno respecto al otro, destacando la mayor fiabilidad de los resultados obtenidos con el segundo.

Además, para realizar los distintos análisis, se han creado varios *scripts* que llevan a cabo todos los pasos necesarios de manera automática sin apenas ser necesaria la intervención del usuario. El funcionamiento de estos *scripts* se detalla en los anexos.

El estudio realizado presenta varias limitaciones. En primer lugar cabe destacar el número, bastante dispar, de sujetos de cada grupo, concretamente de los grupos D (enfermedad de Alzheimer moderada) y E (enfermedad de Alzheimer avanzada). Esto ha provocado que, habiendo encontrado diferencias entre los controles sanos y pacientes en fases poco avanzadas de la enfermedad, no se hayan obtenido las previsibles diferencias entre los controles sanos y pacientes en fases más avanzadas de la enfermedad.

Otra limitación del estudio es el hecho de que no se han considerado factores adicionales, como puede ser la edad, que influyen en la conectividad. Una posible manera de considerar estos factores en el estudio es llevar a cabo un análisis estadístico más completo que los tenga en cuenta. También se pueden corregir los valores de FA y las demás medidas afectadas, en función de la edad de cada sujeto.

Una limitación, que afecta al análisis de conectividad, es que éste se ha realizado a partir de tractografía *streamline*, cuyo resultado son fibras individuales en lugar de probabilidades de conexión. En los casos en los que aparecen pocas fibras en las conexiones, las estadísticas se están calculando sobre un número bajo de las mismas, lo que, como ocurría con los grupos D y E, puede hacer que los resultados estadísticos sean imprecisos e incorrectos. Además, hay que señalar que existen distintos métodos para la corrección del *p-value* por comparaciones múltiples, más complejos que el de Bonferroni utilizado pero también menos restrictivos, que podrían llevar, quizás, a encontrar mayores diferencias entre los distintos grupos.

7.2. Líneas futuras

Finalmente, en cuanto a líneas futuras del estudio realizado, hay que señalar tres aspectos.

En primer lugar, concretar los resultados para los grupos D y E disponiendo de más sujetos para cada uno de ellos. Con un número mayor de datos para estos dos grupos, los resultados estadísticos serían más precisos y veraces y, previsiblemente, se encontrarían diferencias entre ellos y los controles sanos que no han aparecido en el análisis realizado con los datos disponibles.

Por otro lado, profundizar en mayor medida en la conectómica, tanto en los procesos para realizar la parcelación y la tractografía, como en las medidas realizadas. Existen muchas opciones y parámetros variables en los distintos pasos realizados, que pueden dar lugar a resultados distintos. Por ejemplo, el número de regiones corticales puede ser muy distinto. Además, el algoritmo para obtener la tractografía puede influir bastante en las fibras estimadas, especialmente si se emplea tractografía probabilística en lugar de determinística. También pueden realizarse otros cálculos distintos sobre los datos, como valores medios de traza, modo y otras medidas escalares derivadas de los tensores. El análisis de conectómica tiene un gran potencial para encontrar diferencias significativas entre los grupos. Perfeccionando los distintos pasos y refinando y ajustando los parámetros y opciones utilizados, posiblemente se puedan afianzar los resultados obtenidos entre los grupos A y C y entre B y C así como encontrar diferencias entre A y B.

Por último, partiendo de los mismos datos, comparar otros procedimientos diferentes que puedan aportar nuevos resultados. En el análisis realizado se han estudiado tres métodos distintos, pero no son los únicos que existen.

Índice de figuras

3.1. Esquema del proceso del análisis mediante TBSS	24
3.2. Medidas escalares obtenidas a partir de los tensores	25
3.3. Imágenes generadas en el preprocesado de los datos	25
3.4. Imágenes generadas en el proceso de TBSS	27
3.5. Imágenes de FA eskeletonizadas con los distintos umbrales	27
3.6. Diferencias encontradas con TBSS en FA, traza y modo entre los grupos A y C	30
3.7. Diferencias encontradas con TBSS en LM, RD y AD entre los grupos A y C	31
3.8. Diferencias encontradas con TBSS en FA y RD entre los grupos A y D	32
3.9. Diferencias encontradas con TBSS entre los grupos A y C	34
3.10. Diferencias encontradas con TBSS entre los grupos A y D	35
4.1. Esquema del proceso del análisis mediante VBM	38
4.2. Máscaras de FA con los distintos umbrales	39
4.3. Diferencias encontradas con VBM en FA, traza y modo entre los grupos A y C	41
4.4. Diferencias encontradas con VBM en LM, RD y AD entre los grupos A y C	42
4.5. Diferencias encontradas con VBM en FA, traza y modo entre los grupos A y D	43
4.6. Diferencias encontradas con VBM en LM, RD y AD entre los grupos A y D	44
4.7. Diferencias encontradas con VBM entre los grupos A y C	46
4.8. Diferencias encontradas con VBM entre los grupos A y D	47
4.9. Diferencias encontradas con VBM entre los grupos B y C	48
4.10. Efectos del suavizado sobre la FA con distintos valores de núcleo gaussiano	50
4.11. Diferencias encontradas en la FA con distintos valores de núcleo gaussiano	50

4.12. Diferencias encontradas para la FA con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados	51
4.13. Diferencias encontradas para la FA con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados	52
4.14. Diferencias encontradas para la traza con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados	52
4.15. Diferencias encontradas para la traza con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados	53
4.16. Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos A y C empleando distintos suavizados	53
4.17. Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos A y D empleando distintos suavizados	54
4.18. Diferencias encontradas para el modo con VBM entre los grupos B y C empleando distintos suavizados	54
5.1. Esquema del proceso del análisis mediante conectómica	58
5.2. Parcelación	60
5.3. Tractografía global	61
5.4. Parcelación y tractografía	62
5.5. Tractografía entre regiones	64
5.6. Matrices de conectividad	66
5.7. Matrices de parámetros de conectividad	69
6.1. Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 2000	75
6.2. Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 3000	76
6.3. Diferencias encontradas con VBM y TBSS entre los grupos A y C con un umbral de 4000	77
A.1. Estructura de los directorios antes de ejecutar el primer <i>script</i>	95
A.2. Estructura de los directorios tras ejecutar el primer <i>script</i>	98
A.3. Estructura del directorio TBSS/stats antes de ejecutar el segundo <i>script</i>	98
A.4. Estructura de los directorios tras ejecutar el segundo <i>script</i>	100
A.5. Estructura de los directorios tras ejecutar el tercer <i>script</i>	104
A.6. Estructura de los directorios tras ejecutar el cuarto <i>script</i>	107

Índice de cuadros

1.1. Grupos de pacientes	5
3.1. Diferencias encontradas con TBSS	36
4.1. Diferencias encontradas con VBM	49
5.1. Umbrales corregidos del <i>p-value</i>	70
5.2. Diferencias encontradas mediante el análisis de conectómica con anova	71
5.3. Diferencias encontradas mediante el análisis de conectómica con t-test	71
6.1. Diferencias encontradas con los distintos métodos de análisis .	79
B.1. Etiquetas de la parcelación	110

Referencias

- [1] 3D Slicer. <http://www.slicer.org/>. Último acceso: 2014-09-08.
- [2] 3D Slicer documentation: Diffusion Tensor Scalar Measurements. <http://www.slicer.org/slicerWiki/index.php/Documentation/4.3/Modules/DiffusionTensorScalarMeasurements>. Último acceso: 2014-09-11.
- [3] 3D Slicer documentation: Resample Scalar Volume. <http://www.slicer.org/slicerWiki/index.php/Documentation/4.3/Modules/ResampleScalarVolume>. Último acceso: 2014-09-11.
- [4] Definition of NRRD File Format. <http://teem.sourceforge.net/nrrd/format.html>. Último acceso: 2014-09-28.
- [5] DICOM: About DICOM. <http://medical.nema.org/Dicom/about-DICOM.html>. Último acceso: 2014-09-28.
- [6] FMRIB58_FA. http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fsl4.0/tbss/FMRIB58_FA.html. Último acceso: 2014-09-12.
- [7] FNIRT - FslWiki. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FNIRT>. Último acceso: 2014-09-28.
- [8] FreeSurfer. <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>. Último acceso: 2014-09-08.
- [9] FSL. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/>. Último acceso: 2014-09-08.
- [10] Fslutils - FslWiki. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/Fslutils>. Último acceso: 2014-09-17.
- [11] FSLView. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslview/>. Último acceso: 2014-09-11.

-
- [12] Matlab. <http://www.mathworks.es/products/matlab/>. Último acceso: 2014-09-08.
- [13] Modules Diffusion - SlicerWiki. <http://www.slicer.org/slicerWiki/index.php/Documentation/4.3/Modules#Diffusion>. Último acceso: 2014-09-11.
- [14] One-way analysis of variance - MATLAB anova1. <http://www.mathworks.es/es/help/stats/anova1.html>. Último acceso: 2014-09-11.
- [15] Randomise - FslWiki. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/Randomise>. Último acceso: 2014-09-16.
- [16] recon-all - Free Sree Wiki. <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/recon-all>. Último acceso: 2014-09-11.
- [17] TBSS/UserGuide - FslWiki. <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/TBSS/UserGuide>. Último acceso: 2014-09-11.
- [18] Two-sample t-test - MATLAB ttest2. <http://www.mathworks.es/es/help/stats/ttest2.html>. Último acceso: 2014-09-11.
- [19] J. Ashburner and K. J. Friston. A voxel-based morphometric - the methods. *Neuroimage*, 11:805–821, 2000.
- [20] P. J. Basser. Inferring microstructural features and physiological state of tissues from diffusion-weighted images. *NMR in biomedicine*, 8:333–344, 1995.
- [21] P. J. Basser, J. Mattiello, and D. LeBihan. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *Journal of Magnetic Resonance*, 103:247–254, 1994.
- [22] P. J. Basser, J. Mattiello, and D. LeBihan. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66:259–267, 1994.
- [23] P. J. Basser, S. Pajevic, C. Pierpaoli, J. Duda, and A. Aldroubi. In vivo fiber tractography using dt-mri data. *Magnetic resonance in medicine*, 44:625–632, 2000.
- [24] P. J. Basser and C. Pierpaoli. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *Journal of Magnetic Resonance*, 111:209–219, 1996.

-
- [25] M. Bastiani, N. J. Shah, R. Goebel, and A. Roebroeck. Human cortical connectome reconstruction from diffusion weighted MRI: The effect of tractography algorithm. *Neuroimage*, 62:1732–1749, 2012.
- [26] R. Brown. A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine*, 4:161–173, 1828.
- [27] C. R. Buchanan, C. R. Pernet, K. J. Gorgolewski, A. J. Storkey, and M. E. Bastin. Test-retest reliability of structural brain networks from diffusion MRI. *Neuroimage*, 86:231–243, 2014.
- [28] A.M. Dale, B. Fischl, and M.I. Sereno. Cortical surface-based analysis I: Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage*, 9:179–194, 1999.
- [29] A.M. Dale, B. Fischl, and M.I. Sereno. Cortical surface-based analysis II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *Neuroimage*, 9:195–207, 1999.
- [30] D. B. Ennis and G. Kindlmann. Orthogonal tensor invariants and the analysis of diffusion tensor magnetic resonance images. *Magnetic Resonance in Medicine*, 55:136–146, 2006.
- [31] A. Fedorov, R. Beichel, J. Kalpathy-Cramer, J. Finet, J-C. Fillion-Robin, S. Pujol, C. Bauer, D. Jennings, F. Fennessy, M. Sonka, J. Buatti, S.R. Aylward, J.V. Miller, S. Pieper, and R. Kikinis. 3D Slicer as an image computing platform for the quantitative imaging network. *Magnetic Resonance Imaging*, 30:1323–41, 2012.
- [32] B. Fischl, D.H. Salat, E. Busa, M. Albert, M. Dieterich, C. Haselgrove, A. van der Kouwe, R. Killiany, D. Kennedy, S. Klaveness, A. Montillo, N. Makris, B. Rosen, and A.M. Dale. Whole brain segmentation: Automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*, 33:341–355, 2002.
- [33] B. Fischl, A. van der Kouwe, C. Destrieux, E. Halgren, F. Segonne, D. Salat, E. Busa, L. Seidman, J. Goldstein, D. Kennedy, V. Caviness, N. Makris, B. Rosen, and A.M. Dale. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 14:11–22, 2004.
- [34] G. Gong, Y. He, L. Concha, C. Lebel, D. W. Gross, A. C. Evans, and C. Beaulieu. Mapping anatomical connectivity patterns of human cerebral cortex using in vivo diffusion tensor imaging tractography. *Cerebral Cortex*, 19:524–536, 2009.

-
- [35] C. D. Good, I. S. Johnsrude, J. Ashburner, R. N. A. Henson, K. J. Friston, and R. S. J. Frackowiak. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*, 14:21–36, 2001.
- [36] P. Hagmann. From diffusion MRI to brain connectomics. Ph.d. thesis, ITS Institutde traitement des signaux, Université de Lausanne, 2005.
- [37] M. Horsfield. Mapping eddy current induced fields for the correction of diffusion-weighted echo planar images. *Magnetic Resonance Imaging*, 17:1335–1345, 1999.
- [38] M. Jenkinson, C.F. Beckmann, T.E. Behrens, M.W. Woolrich, and S.M. Smith. FSL. *Neuroimage*, 62:782–90, 2012.
- [39] D. K. Jones. Studying connections in the living human brain with diffusion MRI. *Cortex*, 44:936–952, 2008.
- [40] M. Kaiser. A tutorial in connectome analysis: Topological and spatial features of brain networks. *Neuroimage*, 57:892–907, 2011.
- [41] P. C. Lauterbur. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*, 242:190–191, 1973.
- [42] D. LeBihan. Molecular diffusion nuclear magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Quarterly*, 7:1–30, 1991.
- [43] D. LeBihan, E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis, and M. Laval-Jeantet. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 161:401–407, 1986.
- [44] D. LeBihan, J.-F. Mangin, C. Poupon, C. A. Clark, S. Pappata, N. Molko, and H. Chabriat. Diffusion Tensor Imaging: Concepts and Applications. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 13:534–546, 2001.
- [45] S. Mori and P. C. Van Zijl. Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR in biomedicine*, 15:468–480, 2002.
- [46] L. J. O’Donnell and C.-F. Westin. An introduction to diffusion tensor image analysis. *Neurosurgery Clinics of North America*, 22:185–96, 2011.
- [47] S. M. Smith, M. Jenkinson, H. Jehansen-Berg, D. Rueckert, T. E. Nichols, C. E. Mackay, K. E. Watkins, O. Ciccarelli, M. Z. Cader, P. M. Matthews, and T. E. J. Behrens. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage*, 31:1487–1505, 2006.

-
- [48] O. Sporns, G. Tononi, and R. Kötter. The human connectome: a structural description of the human brain. *PLoS Computational Biology*, 1:e42, 2005.
- [49] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42:288–292, 1965.
- [50] C-F. Westin, S. E. Maier, H. Mamata, A. Nabavi, F. A. Jolesz, and R. Kikinis. Processing and visualization for diffusion tensor MRI. *Medical Image Analysis*, 6:93–108, 2002.
- [51] A. M. Winkler, G. R. Ridgway, M. A. Webster, A. M. Smith, and T. E. Nichols. Permutation inference for the general linear model. *Neuroimage*, 92:381–397, 2014.
- [52] I. C. Wright, P. K. McGuire, J-B. Poline, J. M. Traverre, R. M. Murray, C. D. Frith, R. S. F. Frackowiak, and K. J. Friston. A voxel-based method for the statistical analysis of gray and white matter density applied to schizophrenia. *Neuroimage*, 2:244–252, 1995.

Apéndice A

Scripts

Varios *scripts* han sido creados para realizar los análisis descritos a lo largo de la memoria. Estos ejecutan de manera automática distintas etapas del proceso, siendo necesaria la intervención del usuario solo para ejecutarlos y especificar algunos parámetros.

Para comenzar el análisis debe ejecutarse el primer *script* en un directorio (nombrado en el ejemplo *Estudio*) en el que se irán almacenando, en distintos subdirectorios, todos los datos generados. En este directorio debe crearse otro llamado *tensores* con los datos de los tensores. Estos archivos deben tener su nombre terminado en *tensores.nhdr*. Para facilitar el posterior estudio, es recomendable ordenar los datos en función del grupo al que pertenezcan de manera alfabética, por ejemplo, nombrando *A_nombre_archivo_tensores.nhdr* a los de un tipo, *B_nombre_archivo_tensores.nhdr* a los de otro, etc.

En la figura A.1 puede verse la estructura que deben tener estos directorios antes de ejecutarse el primer *script*.

```
-bash-4.1$ ls Estudio  
tensores
```

Figura A.1: Estructura de los directorios antes de ejecutar el primer *script*

A.1. Script 1: preparar_datos_tbss

A.1.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script

Este *script* prepara los datos para el registrado TBSS y realiza los primeros pasos del mismo.

```
$ ./preparar_datos_tbss
```

Debe ejecutarse en un directorio que contenga otro llamado *tensores* con los datos de los tensores. Estos archivos deben tener su nombre terminado en *tensores.nhdr*. Para facilitar el posterior estudio, es recomendable ordenar los datos en función del grupo al que pertenezcan de manera alfabética, por ejemplo, nombrando *A_nombre_archivo_tensores.nhdr* a los de un tipo, *B_nombre_archivo_tensores.nhdr* a los de otro, etc. En este directorio se irán almacenando y organizando todos los datos generados.

Ejecutado el *script*, se necesita que el usuario visualice los datos generados y escoja un valor adecuado para el umbral del esqueleto. Para ello puede emplearse *fslview* [11]:

```
$ fslview TBSS/stats/all_FA -b 0,0.8 TBSS/stats/mean_FA_skeleton
-b 2000,8000 -l Green
```

De esta manera se puede visualizar el archivo 4D con todos los volúmenes de FA registrados y, en color verde, el esqueleto de FA media calculado. Para continuar el proceso, debe ejecutarse, en el mismo directorio e indicando uno o más valores para el umbral, el *script* siguiente:

```
$ ./tbss [UMBRAL1] [UMBRAL2] ... [UMBRALN]
```

A.1.2. Pasos realizados automáticamente por el script

A partir de los tensores, y empleando el módulo de Slicer *DiffusionTensorScalarMeasurements* [2], se generan, para cada sujeto del estudio, las diferentes medidas (FA, traza, modo, LM, RD y AD). La opción *-e* indica qué medida obtener:

```
DiffusionTensorScalarMeasurements -e FractionalAnisotropy
```

Los archivos así generados se almacenan en directorios independientes, creados por el *script*, dentro del directorio padre.

A continuación se transforman los archivos `.nhdr` generados en `.nii` con el módulo *ResampleScalarVolume* [3] de Slicer, quedando almacenados en nuevos directorios (ej. *FA_nii*). Después se reorientan mediante la herramienta *fslreorient2std* [10] de FSL y se almacenan en el mismo directorio.

```
ResampleScalarVolume FA/archivo.nhdr FA_nii/archivo.nii
```

```
fslreorient2std FA_nii/archivo.nii
```

```
FA_nii/archivo_reorientado.nii
```

Una vez obtenidos estos datos puede comenzarse el registro TBSS [17]. Primero se crea un nuevo directorio, *TBSS*, donde se almacenan los datos generados y a continuación se copian los archivos de las FA reorientadas en él. Después se realizan los primeros pasos de TBSS: preprocesado, registro y postregistro.

```
tbss_1_preproc *.nii.gz
```

```
tbss_2_reg -T
```

```
tbss_3_postreg -T
```

Las opciones `-T` de los dos últimos comandos indican que se utiliza el espacio común `FMRIB58_FA` para el registro y el esqueleto asociado al mismo para la esqueletonización.

Tras ejecutar este *script*, la estructura de los directorios con los datos generados queda como se ve en la figura A.2.

```

-bash-4.1$ ls Estudio
AD      FA_nii  Mode    RD_nii  Trace
AD_nii  LM      Mode_nii TBSS     Trace_nii
FA      LM_nii  RD      tensores
-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS
FA origdata stats
-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS/stats
all_FA.nii.gz      mean_FA.nii.gz
mean_FA_mask.nii.gz mean_FA_skeleton.nii.gz

```

Figura A.2: Estructura de los directorios tras ejecutar el primer *script*

A.2. Script 2: tbss

A.2.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script

Este *script* termina de realizar el registrado TBSS y obtiene los valores estadísticos. Debe ejecutarse en el mismo directorio donde se ejecutó *preparar_datos*.

```
$ ./tbss [UMBRAL1] [UMBRAL2] ... [UMBRALN]
```

El umbral, de valor típico 2000 ($FA = 0,2$), indica el valor mínimo de FA que deben tener los puntos que forman el esqueleto. Pueden indicarse uno o más valores numéricos del umbral. Estos valores deben ser números enteros o, en caso contrario, el *script* no se ejecutará de manera correcta.

Para poder realizar el *randomise*, se necesitan los archivos *design.mat* y *design.con*, que especifican a qué grupo pertenece cada dato y las comparaciones a realizar entre los distintos grupos, respectivamente. Estos archivos deben guardarse en *TBSS/stats* antes de ejecutar el *script* (figura A.3). Un ejemplo de estos archivos, para tres grupos y 15 sujetos, puede verse más adelante en las secciones A.2.3 y A.2.4 respectivamente.

```

-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS/stats
all_FA.nii.gz  design.mat      mean_FA.nii.gz
design.con      mean_FA_mask.nii.gz mean_FA_skeleton.nii.gz

```

Figura A.3: Estructura del directorio TBSS/stats antes de ejecutar el segundo *script*

Para cada valor de umbral se tiene, al final del proceso, un directorio denominado *TBSS_UMBRAL* que contiene distintos directorios para cada medida, con los datos copiados de los directorios originales salvo para la FA que son los datos tras procesarlos, así como uno con los datos originales de FA (*origdata*) y otro con los resultados estadísticos (*stats*). Este último contiene el esqueleto obtenido, todas las medidas registradas y eskeletonizadas y un directorio para cada medida con los resultados del *randomise*. Cada uno de estos directorios contiene, a su vez, tres archivos distintos para cada comparación *i*:

- *tbss_tstat*i*.nii.gz*, con el valor de todos los *p-value*.
- *tbss_tfce_p_tstat*i*.nii.gz*, con los resultados del *p-value* sin aplicar la corrección de comparaciones múltiples.
- *tbss_tfce_corr_p_tstat*i*.nii.gz*, con los resultados del *p-value* tras aplicar la corrección.

Para ver estos últimos puede emplearse *fslview* de la siguiente manera:

```
fslview TBSS_UMBRAL/stats/mean_FA_skeleton
TBSS_UMBRAL/stats/FA/tbss_tfce_corr_p_tstat1 -l Red-Yellow
-b 0.95,1
```

Así se visualiza el esqueleto de FA utilizado y, en colores entre rojo y amarillo, los voxels donde se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Cuanto más amarillo es el color, menor es el valor del *p-value*.

A.2.2. Pasos realizados automáticamente por el script

Para cada uno de los umbrales indicados se realiza el último paso del registrado TBSS (*prestats*) y los *randomise* [15] correspondientes. Todos estos datos se guardan en los respectivos directorios denominados *TBSS_UMBRAL*, donde se copian, además, los obtenidos en los primeros pasos de TBSS realizados en el *script* previo.

Una vez copiados los datos necesarios, se ejecuta el último paso de TBSS, la eskeletonización de las FA registradas de cada sujeto, con el umbral indicado.

tbss_4_prestats \$UMBRAL

A continuación se realiza TBSS con las demás medidas, aplicando el esqueleto y las transformaciones calculados a partir de la FA en los pasos previos. Se obtienen así las distintas medidas registradas y esqueletonizadas para todos los sujetos.

tbss_non_FA Trace

El comando *randomise* aplica el análisis estadístico a los voxels correspondientes a la máscara indicada (opción -m), el esqueleto en este caso, del archivo 4D con las imágenes registradas y esqueletonizadas (opción -i). Los archivos resultantes se guardan con el inicio del nombre determinado por la opción -o. Las opciones -d y -t indican los archivos *design.mat* y *design.con*. Finalmente, -n señala el número de permutaciones realizadas, 1000, y --T2 indica que se utilice la opción TFCE (*Threshold-Free Cluster Enhancement*).

```
randomise -i all_FA_skeletonised -o FA/tbss
-m mean_FA_skeleton_mask -d design.mat -t design.con -n 1000
--T2
```

Tras ejecutar este *script* con un umbral de 2000, la estructura de los directorios con los datos generados queda como se ve en la figura A.4.

```
-bash-4.1$ ls Estudio
AD AD_nii FA FA_nii LM LM_nii Mode Mode_nii RD RD_nii TBSS_2000 tensores Trace Trace_nii
-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS_2000
AD FA LM Mode origdata RD stats Trace
-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS_2000/stats
AD
all_AD_nii.gz all_LM_skeletonised.nii.gz all_Fracc_skeletonised.nii.gz mean_FA.nii.gz thresh.txt
all_AD_skeletonised.nii.gz all_Mode_nii.gz design.con mean_FA_skeleton_mask_1st.nii.gz Trace
all_FA_nii.gz all_Mode_skeletonised.nii.gz design.mat mean_FA_skeleton_mask.nii.gz
all_FA_skeletonised.nii.gz all_RD_nii.gz FA mean_FA_skeleton.nii.gz
all_LM_nii.gz all_RD_skeletonised.nii.gz LM Mode
all_LM_skeletonised.nii.gz all_Fracc_nii.gz mean_FA_mask.nii.gz RD
-bash-4.1$ ls Estudio/TBSS_2000/stats/FA
tbss_tfce_corrpt_tstat10.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat2.nii.gz tbss_tfce_p_tstat14.nii.gz tbss_tfce_p_tstat6.nii.gz tbss_tstat18.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat11.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat3.nii.gz tbss_tfce_p_tstat15.nii.gz tbss_tfce_p_tstat7.nii.gz tbss_tstat19.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat12.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat4.nii.gz tbss_tfce_p_tstat16.nii.gz tbss_tfce_p_tstat8.nii.gz tbss_tstat1.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat13.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat5.nii.gz tbss_tfce_p_tstat17.nii.gz tbss_tfce_p_tstat9.nii.gz tbss_tstat20.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat14.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat6.nii.gz tbss_tfce_p_tstat18.nii.gz tbss_tstat10.nii.gz tbss_tstat2.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat15.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat7.nii.gz tbss_tfce_p_tstat19.nii.gz tbss_tstat11.nii.gz tbss_tstat3.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat16.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat8.nii.gz tbss_tfce_p_tstat1.nii.gz tbss_tstat12.nii.gz tbss_tstat4.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat17.nii.gz tbss_tfce_corrpt_tstat9.nii.gz tbss_tfce_p_tstat20.nii.gz tbss_tstat13.nii.gz tbss_tstat5.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat18.nii.gz tbss_tfce_p_tstat10.nii.gz tbss_tfce_p_tstat2.nii.gz tbss_tstat14.nii.gz tbss_tstat6.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat19.nii.gz tbss_tfce_p_tstat11.nii.gz tbss_tfce_p_tstat3.nii.gz tbss_tstat15.nii.gz tbss_tstat7.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat1.nii.gz tbss_tfce_p_tstat12.nii.gz tbss_tfce_p_tstat4.nii.gz tbss_tstat16.nii.gz tbss_tstat8.nii.gz
tbss_tfce_corrpt_tstat20.nii.gz tbss_tfce_p_tstat13.nii.gz tbss_tfce_p_tstat5.nii.gz tbss_tstat17.nii.gz tbss_tstat9.nii.gz
```

Figura A.4: Estructura de los directorios tras ejecutar el segundo *script*

A.2.3. Ejemplo de archivo `design.mat`

Un ejemplo del archivo `design.mat` para tres grupos y 15 sujetos en total es el siguiente:

```
/NumWaves 3
/NumPoints 15
/PPheights 1 1 1
/Matrix
1 0 0
1 0 0
1 0 0
1 0 0
1 0 0
1 0 0
1 0 0
0 1 0
0 1 0
0 1 0
0 1 0
0 1 0
0 0 1
0 0 1
0 0 1
0 0 1
```

Las primeras líneas indican el número de grupos y de sujetos. Cada una de las líneas de la matriz representa a qué grupo pertenece cada sujeto, ordenados por orden alfabético.

A.2.4. Ejemplo de archivo `design.con`

Un ejemplo del archivo `design.con` para tres grupos y 15 sujetos en total es el siguiente:

```
/NumWaves 3
/NumContrasts 6
/PPheights 1 1 1
/Matrix
1 -1 0
-1 1 0
```

```

1 0 -1
-1 0 1
0 1 -1
0 -1 1

```

Las primeras líneas indican el número de grupos y de sujetos. Cada una de las líneas de la matriz representa una comparación a realizar entre los distintos grupos. Por ejemplo, 1 -1 0 busca si el parámetro que se compara es mayor en el primer grupo que en el segundo, mientras que -1 1 0 busca si es menor en el primer grupo que en el segundo.

A.3. Script 3: vbm

A.3.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script

Este *script* termina de realizar el registrado VBM utilizando las herramientas de FSL para TBSS, omitiendo el paso de esqueletonización y utilizando una máscara distinta, y obtiene los valores estadísticos. Debe ejecutarse en el mismo directorio donde se ejecutó *preparar_datos* y *tbss*. Es necesario haber ejecutado los dos *scripts* anteriores para disponer de los datos necesarios para continuar el análisis.

```
$ ./vbm [UMBRAL1] [UMBRAL2] ... [UMBRALN]
```

El umbral, de valor típico 2000 ($FA = 0,2$), indica el valor mínimo de FA que se usa para crear la máscara de la materia blanca. Pueden indicarse uno o más valores numéricos del umbral. Estos valores deben ser números enteros o, en caso contrario, el *script* no se ejecutará de manera correcta. Los umbrales utilizados no tienen por qué ser iguales que los utilizados en el análisis de TBSS.

Para cada valor de umbral se tiene, al final del proceso, un directorio denominado *VBM_UMBRAL* que contiene distintos directorios para cada medida, con los datos copiados de los directorios originales salvo para la FA que son los datos tras procesarlos, así como uno con los datos originales de FA (*origdata*) y otro con los resultados estadísticos (*stats*). Este último contiene la máscara generada, todas las medidas registradas y sus versiones suavizadas y un directorio para cada medida con los resultados de los *randomise*.

Cada uno de estos directorios contiene, para cada comparación i , tres archivos distintos:

- `vbm_tstati.nii.gz`, con el valor de todos los p -value.
- `vbm_tfce_p_tstati.nii.gz`, con los resultados del p -value sin aplicar la corrección de comparaciones múltiples.
- `vbm_tfce_corr_p_tstati.nii.gz`, con los resultados del p -value tras aplicar la corrección.

Para ver estos últimos puede emplearse `fslview` de la siguiente manera:

```
fslview VBM_UMBRAL/stats/mascara
VBM_UMBRAL/stats/FA/vbm_tfce_corr_p_tstat1 -l Red-Yellow
-b 0.95,1
```

Así se visualiza la máscara de FA utilizada y, en colores entre rojo y amarillo, los voxels donde se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Cuanto más amarillo es el color, menor es el valor del p -value.

A.3.2. Pasos realizados automáticamente por el script

Para cada uno de los umbrales indicados se crea una nueva máscara y se ejecutan los *randomise* correspondientes. Todos los datos generados se guardan en los respectivos directorios denominados `VBM_UMBRAL`. Puesto que en realidad se trata de un análisis de TBSS con una máscara de FA distinta, se copian los datos necesarios obtenidos con los primeros pasos de TBSS.

Una vez copiados los datos necesarios (imágenes registradas de todas las medidas), se crea, para cada umbral, una máscara de FA mediante la herramienta `fslmaths` [10]. Esta herramienta primero selecciona los voxels que superan el umbral (opción `-thr`) introducido en el volumen de FA medias y después los binariza (opción `-bin`) creando así la máscara de FA.

```
fslmaths mean_FA.nii.gz -thr $UMBRAL mascara
```

```
fslmaths mascara.nii.gz -bin mascara
```

A continuación, aplica *randomise* a todas las medidas registradas, utilizando como máscara la creada anteriormente. Dado que se está comparando un número mucho mayor de voxels que en el caso de TBSS, el número de permutaciones (opción -n) en este caso se ha reducido a 100, para reducir el tiempo que tarda en ejecutarse.

```
randomise -i all_FA -o FA/vbm -m mascara -d design.mat
-t design.con -n 100 --T2
```

Finalmente, realiza un suavizado de todas las medidas de las imágenes registradas aplicando distintos núcleos gaussianos (de valores 1mm, 3mm y 5mm), mediante la herramienta *fslmaths*. Después repite los *randomise* sobre estos nuevos volúmenes y los almacena indicando en el nombre el valor utilizado.

```
fslmaths all_FA -s 1 all_FA_1
```

```
randomise -i all_FA_1 -o FA/vbm_1 -m mascara -d design.mat
-t design.con -n 100 --T2
```

Tras ejecutar este *script* con un umbral de 2000, la estructura de los directorios con los datos generados queda como se ve en la figura A.5.

```
-bash-4.1$ ls Estudio
AD AD_nii FA FA_nii LM LM_nii Mode Mode_nii RD RD_nii TBSS_2000 tensores Trace Trace_nii VBM_2000
-bash-4.1$ ls Estudio/VBM_2000
AD FA LM Mode origdata RD stats Trace
-bash-4.1$ ls Estudio/VBM_2000/stats
AD all_3D.nii.gz LM mean_FA_skeleton_mask.nii.gz Trace
all_AD.nii.gz all_Fracc.nii.gz mascara.nii.gz mean_FA_skeleton.nii.gz
all_FA.nii.gz design.con mean_FA_mask.nii.gz Mode
all_LM.nii.gz design.mat mean_FA.nii.gz RD
all_Mode.nii.gz FA mean_FA_skeleton_mask_ist.nii.gz thresh.txt
-bash-4.1$ ls Estudio/VBM_2000/stats/FA
vbm_tfce_corrptstat10.nii.gz vbm_tfce_corrptstat5.nii.gz vbm_tfce_p_tstat1.nii.gz vbm_tstat15.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat11.nii.gz vbm_tfce_corrptstat6.nii.gz vbm_tfce_p_tstat20.nii.gz vbm_tstat16.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat12.nii.gz vbm_tfce_corrptstat7.nii.gz vbm_tfce_p_tstat2.nii.gz vbm_tstat17.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat13.nii.gz vbm_tfce_corrptstat8.nii.gz vbm_tfce_p_tstat3.nii.gz vbm_tstat18.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat14.nii.gz vbm_tfce_corrptstat9.nii.gz vbm_tfce_p_tstat4.nii.gz vbm_tstat19.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat15.nii.gz vbm_tfce_p_tstat10.nii.gz vbm_tfce_p_tstat5.nii.gz vbm_tstat1.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat16.nii.gz vbm_tfce_p_tstat11.nii.gz vbm_tfce_p_tstat6.nii.gz vbm_tstat20.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat17.nii.gz vbm_tfce_p_tstat12.nii.gz vbm_tfce_p_tstat7.nii.gz vbm_tstat2.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat18.nii.gz vbm_tfce_p_tstat13.nii.gz vbm_tfce_p_tstat8.nii.gz vbm_tstat3.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat19.nii.gz vbm_tfce_p_tstat14.nii.gz vbm_tfce_p_tstat9.nii.gz vbm_tstat4.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat1.nii.gz vbm_tfce_p_tstat15.nii.gz vbm_tstat10.nii.gz vbm_tstat5.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat20.nii.gz vbm_tfce_p_tstat16.nii.gz vbm_tstat11.nii.gz vbm_tstat6.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat2.nii.gz vbm_tfce_p_tstat17.nii.gz vbm_tstat12.nii.gz vbm_tstat7.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat3.nii.gz vbm_tfce_p_tstat18.nii.gz vbm_tstat13.nii.gz vbm_tstat8.nii.gz
vbm_tfce_corrptstat4.nii.gz vbm_tfce_p_tstat19.nii.gz vbm_tstat14.nii.gz vbm_tstat9.nii.gz
```

Figura A.5: Estructura de los directorios tras ejecutar el tercer *script*

A.4. Script 4: conectomica

A.4.1. Pasos que debe realizar el usuario para la ejecución del script

Este *script* lleva a cabo todo el análisis de conectividad.

```
$ ./conectomica
```

Para ejecutar este *script* no es necesario haber ejecutado anteriormente *preparar_datos*, *tbss* o *vbm*, aunque, en el caso de no ejecutarse previamente *preparar_datos* se debe crear un directorio en aquel en el que se ejecute el *script* llamado *FA* y que contenga los volúmenes de FA en formato *.nhdr*.

En el código del propio *script* están indicados los nombres y los *paths* de los archivos DICOM con las imágenes T1 y DWI.

A.4.2. Pasos realizados automáticamente por el script

En primer lugar se realiza la segmentación y la parcelación cortical mediante la herramienta *recon-all* [16] de Freesurfer. La opción *-i* indica el *path* de la primera imagen T1 y *-subjid* el nombre con el que se identifica el sujeto. Para que se realice todo el proceso de reconstrucción se utiliza la opción *-all*.

```
recon-all -i archivo_T1 -subjid identificador_sujeto -all
```

A continuación se transforman con la herramienta *mri_convert* los archivos *aparc+aseg.mgz*, que contiene las etiquetas de la parcelación y la segmentación, a formato *.nii* para que Slicer los reconozca.

```
mri_convert aparc+aseg.mgz aparc_aseg.nii
```

Después se obtienen las tractografías globales con Slicer en varios pasos [13]. El primero, *DWIConvert*, convierte todos los archivos DICOM del directorio indicado (opción *-- inputDicomDirectory*) a formato *.nhdr* (opción *-- conversionMode DicomToNrrd*) y lo guarda con el nombre indicado por la opción *-- outputVolume*. El segundo, *DiffusionWeightedVolumeMasking*, genera el volumen base y la máscara, eliminando de la misma las zonas aisladas (opción *-- removeislands*). El tercero, *DWIToDTIEstimation*, crea un

modelo estimado de los tensores de difusión en la zona indicada por la máscara (opción `-- mask`) mediante el método de mínimos cuadrados (opción `-- enumeration LS`). Por último, *TractographyLabelMapSeeding* calcula la tractografía. Las opciones `-- clthreshold 0.1 -- stoppingvalue 0.1` indican el valor mínimo de la FA para el que se empiezan y terminan de obtener las fibras. Se ha disminuido respecto al valor por defecto (0,03) con la intención de facilitar que los extremos de las fibras llegen hasta las distintas regiones corticales.

```
DWIConvert --conversionMode DicomToNrrd --outputVolume DWI.nrrd
--inputDicomDirectory directorio_DWIs --outputDirectory
identificador_sujeto
```

```
DiffusionWeightedVolumeMasking --removeislands DWI.nrrd
estimated_baseline_volume.nrrd threshold_mask.nrrd
```

```
DWIToDTIEstimation --mask threshold_mask.nrrd --enumeration LS
DWI.nrrd estimated_DTI_volume.nrrd
estimated_baseline_volume.nrrd
```

```
TractographyLabelMapSeeding --clthreshold 0.1
--stoppingvalue 0.1 estimated_DTI_volume.nrrd tractografia.vtp
```

Con la tractografía global y la parcelación obtenidas, se obtienen los subconjuntos de fibras que conectan las distintas regiones utilizando el módulo de Slicer *FiberBundleLabelSelect*. Este módulo selecciona aquellas fibras que pasan por ciertas regiones (opción `-p`) pero no por ciertas otras (opción `-n`).

```
FiberBundleLabelSelect -p regiones_incluidas
-n regiones_excluidas aparc_aseg.nii tractografia.vtp
tractografia_entre_regiones.vtp
```

Finalmente, empleando Matlab, se calculan las matrices de conectividad y los distintos parámetros a partir de ellas y se realiza el análisis estadístico de los datos resultantes, para lo cual hace uso de los *scripts* de Matlab *matrices_conectividad.m* (A.4.3) y *analisis_estadistico.m* (A.4.4). Antes de eso, descomprime los archivos con las FA y transforma los archivos con las tractografías en formato `.vtp` a formato `.vtk` para que puedan cargarse en Matlab.

Todos los datos generados se almacenan en un directorio denominado *Conectomica*. Los subdirectorios *segmentación* y *tractografías* contienen los resultados de las funciones de Freesurfer y Slicer respectivas. Las matrices y

vectores con la información de conectividad se almacenan en distintos archivos en directorios de nombre *matrices_conectividad*, *anova* y *ttest*, mientras que por pantalla se muestran aquellos parámetros obtenidos que presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tras ejecutar este *script*, la estructura de los directorios con los datos generados queda como se ve en la figura A.6.

```
-bash-4.1$ ls Estudio
AD AD_nii Conectomica FA FA_nii LM LM_nii Mode Mode_nii RD RD_nii TBSS_2000 tensores Trace Trace_nii VBM_2000
-bash-4.1$ ls Estudio/Conectomica
anova matrices_conectividad segmentacion tractografias ttest
```

Figura A.6: Estructura de los directorios tras ejecutar el cuarto *script*

A.4.3. Script de Matlab: matrices de conectividad

Este *script* de Matlab calcula las matrices y los parámetros de conectividad a partir de las tractografías entre las distintas regiones.

En primer lugar, para cada volumen de FA, obtiene las coordenadas y el tamaño del mismo leyendo el archivo *.nhdr*. A continuación, carga los datos de los volúmenes de los archivos *.raw* en una matriz y lo remodela de acuerdo a sus coordenadas y tamaño.

Para cada conexión obtiene las distintas medidas de conectividad (número de fibras, *fa* media y distancia mínima) y las almacena en distintas matrices. Para cargar los datos de las fibras (número de fibras y los puntos que las forman) hace uso de la función *read_vtk_tractographyV2*. Las FA se obtienen leyendo en la matriz de FA cargada las coordenadas de los puntos que forman las fibras. Como las fibras son las mismas de la región R_i a la región R_j que de la región R_j a la región R_i , se guarda el mismo valor en las posiciones correspondientes, dando lugar a matrices simétricas. Para cada sujeto, guarda las distintas matrices en el directorio *matrices_conectividad*.

A continuación se calculan los distintos parámetros de conectividad (regiones conectadas, fibras por región, FA por región, longitud mínima media y coeficiente de agrupación) para cada región, dando lugar a un vector para cada sujeto del estudio. Estos vectores se agrupan en una misma matriz para cada parámetro y se almacenan en el directorio *matrices_conectividad*.

A.4.4. Script de Matlab: análisis estadístico

Este *script* de Matlab realiza el análisis estadístico de las medidas de conectividad obtenidas con *matrices_conectividad.m*.

En primer lugar carga todas las matrices con las medidas y los parámetros de conectividad y calcula el valor medio de estos últimos para paciente. Después lleva a cabo dos comparaciones distintas.

- Anova: Compara todos los grupos a la vez y proporciona el *p-value* para cada medida, almacenándolos en nuevas matrices en el directorio *anova*. Usa la función `anova1(matriz, grupos, 'off')`, donde *matriz* contiene todos los valores a comparar de cada medida, *grupos* es un vector donde se indica a qué grupo pertenece cada valor y la opción *off* establece que no se muestre información complementaria del test realizado.
- T-test: Realiza las comparaciones de los grupos de dos en dos y proporciona el *p-value* para cada medida, almacenándolos en nuevas matrices en el directorio *ttest*. Usa la función `ttest2(matriz1, matriz2)`, donde *matriz1* y *matriz2* contienen todos los valores de cada uno de los dos grupos a comparar.

A continuación, se realiza una corrección de los *p-values* teniendo en cuenta las comparaciones múltiples llevadas a cabo, mediante la corrección de Bonferroni. Finalmente, se muestra por pantalla una lista de aquellas medidas que presentan diferencias estadísticamente significativas indicando en qué conexiones o regiones aparecen y, en el caso de t-test, para qué comparaciones.

Apéndice B

Etiquetas de la parcelación

El cuadro B.1 muestra la lista de las etiquetas creadas por FreeSurfer para las regiones de la corteza cerebral, que son las utilizadas en el análisis de conectómica. Las etiquetas que empiezan por 10 pertenecen al hemisferio izquierdo (lh, *left hemisphere*), mientras que las que empiezan por 20 pertenecen al derecho (rh, *right hemisphere*).

1001	lh-bankssts	2001	rh-bankssts
1002	lh-caudalanteriorcingulate	2002	rh-caudalanteriorcingulate
1003	lh-caudalmiddlefrontal	2003	rh-caudalmiddlefrontal
1005	lh-cuneus	2005	rh-cuneus
1006	lh-entorhinal	2006	rh-entorhinal
1007	lh-fusiform	2007	rh-fusiform
1008	lh-inferiorparietal	2008	rh-inferiorparietal
1009	lh-inferiortemporal	2009	rh-inferiortemporal
1010	lh-isthmuscingulate	2010	rh-isthmuscingulate
1011	lh-lateraloccipital	2011	rh-lateraloccipital
1012	lh-lateralorbitofrontal	2012	rh-lateralorbitofrontal
1013	lh-lingual	2013	rh-lingual
1014	lh-medialorbitofrontal	2014	rh-medialorbitofrontal
1015	lh-middletemporal	2015	rh-middletemporal
1016	lh-parahippocampal	2016	rh-parahippocampal
1017	lh-paracentral	2017	rh-paracentral
1018	lh-parsopercularis	2018	rh-parsopercularis
1019	lh-parsorbitalis	2019	rh-parsorbitalis
1020	lh-parstriangularis	2020	rh-parstriangularis
1021	lh-pericalcarine	2021	rh-pericalcarine
1022	lh-postcentral	2022	rh-postcentral

1023	lh-posteriorcingulate	2023	rh-posteriorcingulate
1024	lh-precentral	2024	rh-precentral
1025	lh-precuneus	2025	rh-precuneus
1026	lh-rostralanteriorcingulate	2026	rostralanteriorcingulate
1027	lh-rostralmiddlefrontal	2027	rostralmiddlefrontal
1028	lh-superiorfrontal	2028	rh-superiorfrontal
1029	lh-superiorparietal	2029	rh-superiorparietal
1030	lh-superiortemporal	2030	rh-superiortemporal
1031	lh-supramarginal	2031	rh-supramarginal
1032	lh-frontalpole	2032	rh-frontalpole
1033	lh-temporalpole	2033	rh-temporalpole
1034	lh-transversetemporal	2034	rh-transversetemporal
1035	lh-insula	2035	rh-insula

Cuadro B.1: Etiquetas de la parcelación