



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO NEUROSCIENZE

CICLO XXIV

***STUDIO MULTIDISCIPLINARE SULLE COMPLICANZE
NEUROLOGICHE IN BAMBINI AFFETTI DA DREPANOCITOSI.
VALUTAZIONE CON METODICHE ULTRASONOGRAFICHE,
NEURORADIOLOGICHE, TEST NEUROPSICOLOGICI E
NEUROFISIOLOGICI***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Elena Pegoraro

Supervisore :Ch.mo Prof. Carlo Semenza

Dottorando : Dr. Patrizia Rampazzo

CAPITOLO		pag
	RIASSUNTO	1
	ABSTRACT	3
1	INTRODUZIONE	5
1.1	LA DREPANOCITOSI	5
1.1.1	Definizione e storia	5
1.1.2	Epidemiologia	6
1.1.3	Eziopatogenesi	10
1.1.4	Diagnosi	12
1.1.5	Clinica	12
1.1.6	Assistenza al pz. con AF	14
1.1.7	Terapia	14
1.2	COMPLICANZE NEUROLOGICHE	16
1.2.1.	Uso TCD nel predire le complicanze neurologiche e studio STOP	17
2	SCOPO DELLA RICERCA	21
3	CONFRONTO TCD e TCCS	22
3.1	MATERIALI E METODI	22
3.1.1	Basi Teoriche del Doppler	22
3.1.2	TCD	24
3.1.3	TCCS	27
3.2	ANALISI STATISTICA	29
3.3	RISULTATI	29
3.4	DISCUSSIONE	39
4	VALUTAZIONE RMN e AngioRM	43
4.1	MATERIALI E METODI	43
4.2	ANALISI STATISTICA	44
4.3	RISULTATI	44
4.3.1	Confronto AngioRM verso TCCS e TCD correlazione	44
4.3.2	AngioRM rispetto a sesso ed età	47
4.3.3	AngioRM e Doppler rispetto agli IS	48
4.4	DISCUSSIONE	48
5	VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA	51
5.1	MATERIALI E METODI	51
5.2	ANALISI STSTISTICA	53
5.3	RISULTATI	53
5.4	DISCUSSIONE	58

6	VALUTAZIONE NEUROFISIOLOGICA	59
6.1	MATERIALI E METODI	59
6.1.1	Potenziali Evocati	59
6.1.2	Acquisizione P 300	60
6.1.3	Low Resolution Tomography (LORETA)	61
6.2	ANALISI STATISTICA	63
6.3	RISULTATI	63
6.3.1	Analisi della varianza per misure ripetute	64
6.3.1	Analisi con LORETA	67
6.4	DISCUSSIONE	72
7	ANALISI VOLUMETRICA (Free Surfer)	75
7.1	MATERIALI E METODI	75
7.2	ANALISI STATISTICA	76
7.3	RISULTATI	77
7.3.1	Cortical Thickness	77
7.3.2	Volume Corticale	78
7.3.3	Area della Sostanza Bianca	78
7.4	DISCUSSIONE	80
8	CONCLUSIONI GENERALI	83
	BIBLIOGRAFIA	85

RIASSUNTO

La Drepanocitosi, chiamata anche Anemia a Cellule Falciformi (SCD sickle cell disease) è una malattia congenita ed ereditaria dell'emoglobina e rappresenta nel mondo, la più comune malattia genetica.

Ogni anno nascono più di 300.000 bambini con SCD, la maggior parte in Africa, India e Albania, secondo i dati dell'OMS nel 2008. La SCD è diventata un problema in crescita a livello mondiale. Le complicanze neurologiche sono frequenti e tra le più serie e disabilitanti. Lo stroke sintomatico accade in circa 11% dei pazienti con SCD prima dei 20 anni (*Ohene-Frempong K. 1998*) e circa il 35% presenta lesioni silenti alla RMN (*Pegelow C. 2002*) con relativo coinvolgimento psico-cognitivo e deficit di apprendimento (*Schatz J 2002*).

Programmi di screening per la prevenzione dell'ictus (studio STOP e linee guida SPREAD) sono stati condotti con l'uso del TCD (*Adams R. 1998*). Il TCD può misurare le velocità di flusso ematico delle grandi arterie della base cranica. Lo studio STOP ha dimostrato la validità del TCD nell'identificare i bambini a rischio stroke: le velocità ematiche > 200 cm/s a livello dell'Arteria Cerebrale Media correlavano con elevato rischio di stroke in una coorte di bambini Afro-americi omozigoti HbS/HbS (*STOP study Adams 1998-2000*).

Il rischio si riduceva del 90% quando questi bambini venivano sottoposti a terapia trasfusionale cronica (*STOP2*).

Altri studi effettuati con uso di RMN, hanno rilevato la prevalenza di Infarti Silenti (I.S.) in bambini con SCD senza sintomi neurologici associati (*Pegelow et al. 2002*).

Gli Infarti Cerebrali Silenti sono responsabili di deficit neuro-cognitivi, basso QI e problemi scolastici.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare da un punto di vista multidisciplinare i vari aspetti di coinvolgimento neurologico in pazienti con SCD. Sono stati quindi utilizzate metodiche Ultrasonografiche (TCD e TCCS) , Neuropsicologiche, Neurofisiologiche, e Neuroradiologiche.

La prima parte dello studio ha riguardato la comparazione tra due metodiche Ultrasonografiche : TCCS e TCD: una "cross sectional" e un'analisi di "follow up". L'obiettivo è stato quello di supportare l'ipotesi che il TCCS possa essere più utile e indicato nello screening per identificare il rischio di stroke nelle SCD

La seconda fase si è poi sviluppata nel verificare l'ipotesi che la combinazione dei risultati ottenuti con TCD, Angio-RMN e MRI potesse identificare i bambini che sviluppavano I.S. rispetto a quelli che non li sviluppavano. I nostri risultati non hanno però supportato tale ipotesi.

La terza fase è stata quella di valutare le performance cognitive dei bambini con e senza I.S. Sono stati somministrati test Neuropsicologici (Wechsler Intelligence Scales for Children, WISC and Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence, WPPSI). Il QIP (quoziente intellettivo di Performance) e altri subtest si sono dimostrati significativamente compromessi nel gruppo di bambini SCD con presenza di I.S.

Infine l'obiettivo della quarta fase è stato quello di valutare dal punto di vista neurofisiologico (analisi morfologica e di LORETA nella P300) e studio volumetrico della RMN (Free Surfer software) la differenza tra un sottogruppo di pazienti con e senza I.S. e un gruppo di controllo di età sovrapponibile.

I generatori della P300 sono stati dimostrati essere gli stessi nel gruppo SCD e nei controlli, senza significativa differenza tra I.S. verso non I.S. Il gruppo SCD ha mostrato il coinvolgimento di più networks corticali e che permanevano attivi più a lungo: ciò suggerisce la probabile presenza di un processo compensativo.

Lo studio volumetrico ha evidenziato differenze significative in alcune aree corticali ma non nella regione ippocampale: questo risultato può essere dovuto al fatto che il circolo posteriore risulta meno compromesso nelle SCD.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder caused by abnormal haemoglobin that damages and deforms red blood cells. Sickle cell anemia (SCA) is the most severe form of SCD developing when two sickle genes are inherited (homozygotic HbSS) . Sickle cell disease is in the world, the most common genetic disease. Each year more than 300,000 children are born with SCD, mainly in Africa, India and Albania (data WHO 2008). The SCA is an increasing global health problem .

Neurologic complications are frequent among the most serious and disabling. Stroke is a frequent complication of SCD. Approximately 11% of children have a clinical stroke before 20 years of age (*Ohene-Frempong K. 1998*) and another 35% have a silent infarcts on magnetic resonance imaging (*Pegelow C. 2002*) with serious sequelae psycho-cognitive and learning difficulties (*Schatz J 2002*).

Screening programs for stroke prevention in SCD children have been implemented using Transcranial Doppler (TCD) (*Adams R. 1998*) by STOP study and SPREAD guidelines. TCD can measure flow velocities in the large intracranial arteries; long term prospective studies have demonstrated the validity of TCD in identifying children at risk of stroke due to increased cerebral velocities.

A blood flow velocity > 200 cm/s in the middle cerebral artery (MCA), correlates with a high risk of stroke in cohorts of African-american HbS/HbS patients (*STOP study Adams 1998-2000*). The risk is reduced by 90% if those patients are receiving chronic transfusion therapy (*STOP2*). Another study, using MRI, revealed the prevalence of silent infarcts in school-aged children with homozygous but without associated focal neurological symptoms (*Pegelow et al. 2002*). Silent Cerebral Infarcts are increasingly recognized as a major cause of school problems, lower intelligence quotient (IQ) and other neurocognitive deficits. The effect of increased tissue injury in children with sickle cell disease and silent cerebral infarcts is not known.

The purpose of this research was to evaluate the various aspects of the neurological involvement in patients with sickle cell anemia.

These goals require a necessarily multidisciplinary approach to the study, namely neurosonology, neuropsychology, neurophysiology and neuroimaging.

The first phase of the present study was devoted to the comparison between the two neurosonological methods of non-imaging and imaging TCD (TCCS and TCD). A cross sectional and a follow up analysis were carried out in a group of children in which both methods were used.

This study can support the hypothesis that the TCCS is more suitable for screening in SCD and useful to refine the stroke risk in SCD children.

In the second stage we evaluated the hypothesis that the combination of results obtained with the Doppler, AngioRMN and MRI could identify children who developed IS compared to those not developing. Our results do not support this hypothesis.

In the third step we evaluated the cognitive performance of children with and without I.S.

Neuropsychological tests were used (Wechsler Intelligence Scales for Children, WISC and Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence, WPPSI). The QIP and some subtest was found significantly compromised in I.S. group. Finally, the fourth phase had the objective to evaluate any differences in the group with and without I.S. versus an age matched control group, from a neurophysiological point of view (morphological and LORETA analysis of P300), and from a MRI volumetric study (Free Surfer software). The generators of P300 are demonstrated to be the same in SCD group, without differences between the I.S. versus non I.S. group. SCD group showed a more involved network and a prolonged activation, suggesting a widely involvement of neural networks probably due to a compensative process. The volumetric study found significant differences in some cortical areas, but not in the hippocampal region: these results may be explained considering that the posterior circulation is less compromised in SCD.

INTRODUZIONE

Lo Stroke è un evento drammatico, soprattutto se accade in un bambino. L'Ictus ischemico nella Drepanocitosi, rappresenta una delle maggiori e più temibili complicanze in età pediatrica ha una prevalenza del 4% con un incremento del rischio Stroke 220 volte superiore rispetto a soggetti sani di pari età. (Ohene-Frempong F et al., 1998)

Il rischio di sviluppare uno stroke ischemico prima dei 20 anni è dell'11% nei pazienti con Anemia Falciforme (Sarnaik SA & Luser JM 1982). Inoltre circa il 17-22% di questi pazienti presentano prima dei 20 anni lesioni subcliniche alla RMN (Miller ST et al. 2001, Buchanan GR et.al., 2004) che possono presentarsi anche entro il primo anno di età (Wang WC et. al.,2008). Tali lesioni sono risultate correlare con deficits neuropsicologici (Amstrong FD et al. 1996 Schaltz J et al. 2002a). La distribuzione delle lesioni alla RMN interessa prevalentemente le regioni frontoparietali e periventricolari della sostanza bianca (Kwiarkowski JL 2009). L'infarto silente non si riconosce clinicamente ma può essere causa in un bambino in età scolare di difficoltà di apprendimento e compromettere le funzioni psico-cognitive. Inoltre i pazienti con presenza di infarti silenti (I.S.) hanno un incremento di rischio stroke 14 volte superiore rispetto ai pazienti senza I.S. (Krejza J. et al 2010). L'impatto dei danni neurologici sottolinea la necessità di identificare i pazienti a rischio che possono beneficiare delle terapie preventive.

1.1 LA DREPANOCITOSI

1.1.1 Definizione e Storia

La Drepanocitosi o Anemia a Cellule Falciformi (AF) o Sickle Cell Disease (SCD) è caratterizzata da un gruppo di malattie ereditarie dell'emoglobina caratterizzate da anemia emolitica cronica, aumentata suscettibilità alle infezioni, danno d'organo ed episodi di occlusione vascolare che causano crisi dolorose acute e croniche.

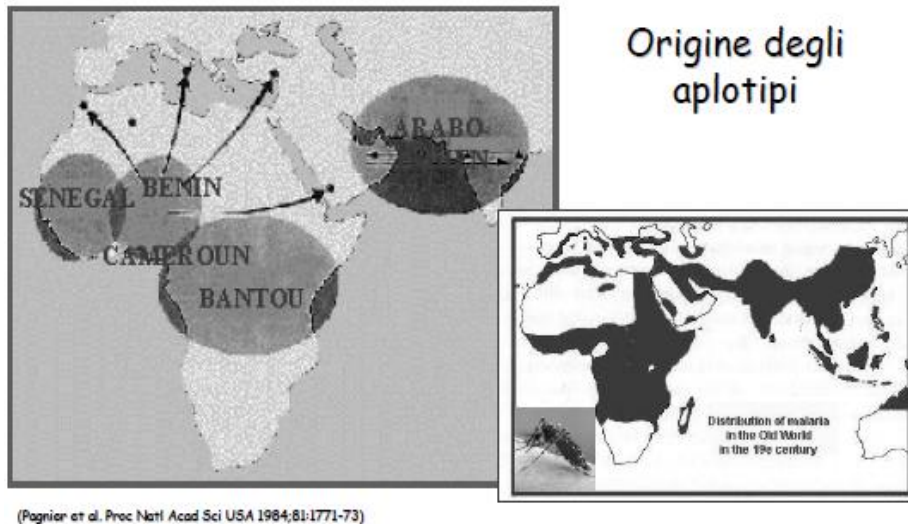
Le popolazioni del Ghana conoscono la malattia da secoli e già nel 1600 riferendosi alle crisi dolorose caratteristiche della patologia, le avevano dato nomi che ne sintetizzano chiaramente le caratteristiche: "*corpo tormentato, battuto, morsicato*". Nulla sapevano ovviamente della falcizzazione degli eritrociti. La prima descrizione di cellule falciformi venne fatta nel 1910 da un

cardiologo di Chicago J.Herrick il quale esaminò uno studente afroamericano di 20 anni, che presentava debolezza, vertigini, mal di testa, tosse, palpitazione e difficoltà respiratoria, cuore ingrossato, ittero oculare. Osservò “*peculiar anlongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia*” e intuì che essi dovevano essere responsabili delle manifestazioni della malattia (Herrick 1910).

Negli anni successivi Sydenstricker introdusse il termine di “*crisi*” per descrivere gli episodi acuti di dolore e associò la malattia ad un’anemia emolitica. Hahn e Gillespie nel 1927 definirono la base patogenetica della malattia attribuendola ad alterazioni a carico delle catene emoglobiniche, dimostrando inoltre la familiarità della malattia e il fenomeno della falcizzazione (Hahn EV et al.1927). In Italia, Silvestroni e Bianco nel 1944 descrissero il primo caso al mondo di associazione con la β -talassemia, che chiamarono “*microdrepanocitosi*” in una ragazza del Lazio che presentava febbre, dolori, aumento del volume del fegato e della milza (Silvestroni E et. al. 1946). Negli Stati Uniti nel 1947 Neel dimostrò l’ereditarietà della malattia e ne definì le modalità di trasmissione. Infine nel 1949, Pauling et al. evidenziarono la presenza negli eritrociti a falce di una emoglobina anomala S (HbS) che possedeva diversa mobilità elettroforetica rispetto all’emoglobina adulta (Hb) e per la prima volta venne usata la definizione di malattia molecolare (Pauling L.et al,1949). Questo valse a Pauling il premio Nobel. Watson poi notò che i primi sintomi apparivano nei lattanti solo con il calo dell’emoglobina fetale (HbF) e stabilì le basi per un intervento terapeutico mirato ad aumentare la quantità di HbF (Watson J, et.al. 1948).

1.1.2 Epidemiologia

Dati recenti della Organizzazione Mondiale Salute (WHO 2008) indicano che il 5,2% della popolazione mondiale è portatore di emoglobinopatie particolarmente rilevanti e di questi circa il 40% è rappresentato dai portatori della mutazione β^s . Ogni anno al mondo più di 330.000 bambini nascono con emoglobinopatie (Modell B et al.,2008), di queste l’83% sono anemie falciformi e oltre a queste il 7% della popolazione mondiale è portatore di una variante emoglobinica (Aliyu ZY et al.,2007).



In Africa le percentuali sono molto più alte. Le regioni con più elevata presenza di HbS sono quelle dell’Africa Equatoriale, dove si registrano frequenze comprese tra 10 e 30%. Sono per lo più Nigeriani con più 17.267.295 portatori di HbS e 6 milioni di soggetti affetti stimati. L’inusuale alta frequenza del gene β^S in regioni attualmente o in passato endemiche per la malaria è stata spiegata con la “malaria hypotesis” secondo la quale la presenza di HbS allo stato eterozigote svolge un ruolo protettivo nei confronti dell’infezione da *Plasmodium falciparum* (Haldane JBS 1949). Infatti gli eritrociti mutati e parassitati presentano precocemente una maggiore fagocitosi da parte dei macrofagi che allontana il parassita prima che completi il suo ciclo vitale. Questo permette all’eterozigote HbS un’attenuazione della malattia e una migliore sopravvivenza rispetto al soggetto non portatore (Ayi K. et al.,2004). Studi molecolari del gene β unitamente a studi epidemiologici, hanno fatto supporre che la mutazione si sia originata in modo indipendente in almeno 5 distinte aree geografiche, di cui 4 in Africa e 1 in India. Sono infatti stati descritti 5 aplotipi del gene β^S : Bantu(o CAR, Repubblica Africana Centrale) Benin, Cameroun, Senegal e Arabo-Indiano (Nagel RL. et al.,1990). I singoli aplotipi sono associati a diversi gradi di severità del fenotipo clinico e si distinguono tra loro prevalentemente in base alla percentuale di HbF. Ad esempio gli aplotipi Senegal e Arabo-Indiano sono associati ad un quadro clinico più lieve in quanto i livelli di HbF sono più elevati rispetto agli altri aplotipi (Powars DR et al.,1990;1993). La mutazione si è diffusa poi in altre parti del mondo seguendo le

correnti migratorie, scambi commerciali e soprattutto il commercio degli schiavi. Nel bacino del Mediterraneo e in Arabia Occidentale si è diffuso l'aplotipo Benin confermando la provenienza africana del gene β^s siciliano. Nelle regioni arabo-indiane e americane gli aplotipi Bantu e Benin. La Drepanocitosi è diventata così frequente in Europa che è stata definita come il “paradigma di patologia dell’immigrazione” “*paradigm of immigration hematology*” (Roberts I. et al. 2007). Nel 2006 l’OMS ha adottato una risoluzione in cui invitava i Governi a sviluppare politiche dedicate alla cura della Drepanocitosi e, in particolare a “*design, implement, reinforce in a systematic, equitable and effective manner, comprehensive national integrated programs for the prevention and management of SCD reducing morbidity and mortality*” .

Successivamente nel 2008 l’Assemblea Generale dell’ONU nomina il 19 Giugno di ogni anno la Giornata Mondiale della Drepanocitosi allo scopo di diffondere l’informazione e sensibilizzare le popolazioni riguardo questa malattia.

Infatti anche se i programmi di assistenza medica hanno dimostrato di ridurre la morbilità e la mortalità grazie alle cure sanitarie, solo il 36% dei bambini con SCD esegue almeno una visita all’anno in USA e meno del 50% dei piccoli pazienti sono iscritti in programmi di screening con TCD per la prevenzione dell’ictus: sia in Europa che in America (Raphael JL et al. 2008).

In Europa solo alcuni paesi con maggior densità di popolazione a rischio hanno adottato programmi di screening neonatale mirato o universale.

Paese	Anno inizio	Modalità di screening
Inghilterra e Galles	2005	Universale
Francia-Guadalupa, Indie Occidentali	1985	Mirato
Francia Intera	1996	Mirato
Belgio (area Brussels)	1994	Universale
Olanda	2007	Universale
Spagna (Estremadura e Madrid)	2007	Universale

Paesi europei in cui esiste attualmente lo screening neonatale (dati A.I.E.O.P)

In Italia fino agli anni '50 il gene S era proprio delle popolazioni meridionali e dei siciliani, presente sia nella forma omozigote (SS) che nella forma di eterozigosi composta (S- β^t). In seguito alle migrazioni nazionali, verificatesi nel dopoguerra, la malattia si è diffusa in tutto il territorio nazionale soprattutto nelle aree industrializzate dell’Italia settentrionale (Russo-Mancuso G et. al., 1998) . Durante gli ultimi anni il dirompente fenomeno dell’immigrazione

da paesi dove la patologia ha una elevata prevalenza ha contribuito a diffondere la Drepanocitosi in Italia (Russo-Mancuso G. et al., 2003). In Italia è boom delle emoglobinopatie ed il trend è in crescita trainato dagli immigrati. Da un censimento eseguito tra il 2008 e il 2010 nei 134 centri Italiani di cura talassemici la stima è di 7.000 pazienti affetti e gli specialisti parlano di una “*malattia emergente*” (Congresso Emoglobinopatie Firenze 2011). La Drepanocitosi in Italia è compresa tra le Malattie Rare in base al DM n.124 del 29 Aprile 1998 e DM n.279 del 18 Maggio 2001: codice DRG010.

In Italia uno screening mirato è iniziato nel 2009 in Friuli Venezia Giulia.

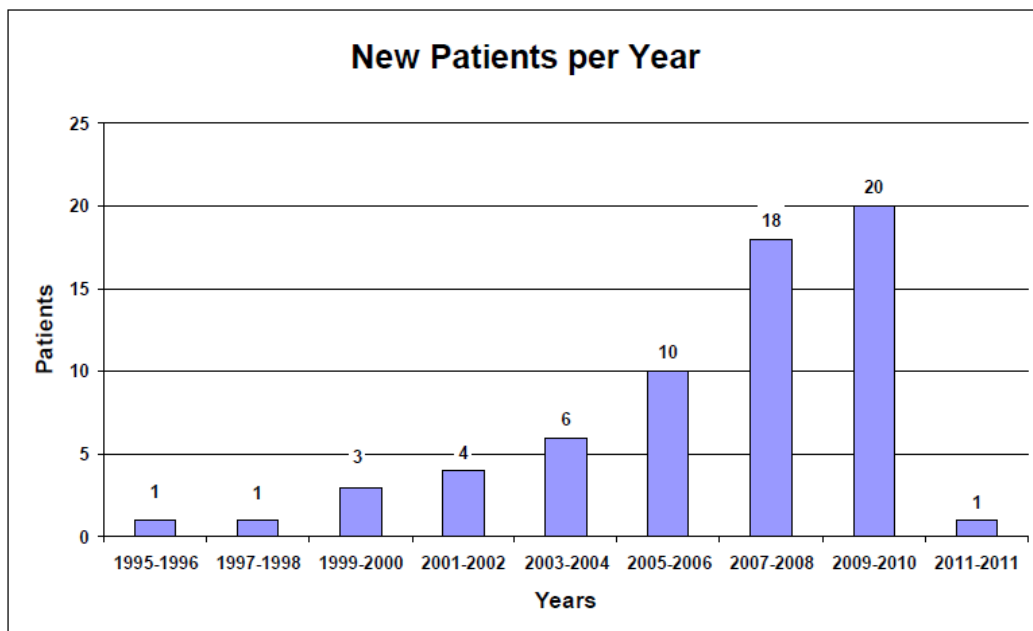
Secondo le linee guida A.I.E.O.P. viene raccomandato lo screening neonatale universale o almeno mirato alle categorie a rischio. A questo deve seguire un programma di informazione, la presa in carico del paziente con la messa in atto delle adeguate misure di follow up.

	Cens. 1991	Cens. 2001	Popolazione residente al 31 Dic. 2008	Popolazione residente al 31 Dic. 2009	Comp.% Censimento 1991	Comp.% 31 Dic. 2009	Comp.% 31 Dic. 2010
Lombardia	77.298	319.564	904.816	994.000	21,7%	25,3%	25,2%
Lazio	61.345	151.567	450.151	505.000	17,2%	11,7%	11,4%
Veneto	25.471	138.074	454.453	489.000	7,2%	11,7%	11,4%
Emilia Romagna	28.762	135.453	421.482	467.000	8,1%	10,8%	10,9%
Piemonte	24.709	110.402	351.112	381.000	6,9%	9,0%	8,9%
Toscana	28.059	108.702	309.651	342.000	7,9%	8,0%	8,0%
Campania	16.991	40.430	131.355	147.000	4,8%	3,4%	3,4%
Marche	7.485	45.668	131.053	145.000	7,1%	3,4%	3,5%
Sicilia	24.939	49.339	114.652	129.000	7,0%	2,9%	3,0%
Abruzzo	11.125	35.950	104.701	116.000	3,1%	2,7%	2,7%
Friuli V. Giulia	9.122	38.122	94.976	104.000	2,6%	2,4%	2,4%
Umbria	5.578	27.266	85.947	94.000	1,6%	2,2%	2,2%
Trentino A. Adige	7.897	30.326	78.861	86.000	2,2%	2,0%	2,0%
Puglia	8.925	30.161	75.848	85.000	2,5%	1,9%	1,9%
Abruzzo	5.414	21.399	69.641	72.000	1,9%	1,8%	1,8%
Calabria	4.899	18.017	58.775	65.000	1,4%	1,5%	1,5%
Sardegna	5.491	10.755	29.557	33.000	1,5%	0,8%	0,8%
Basilicata	910	3.416	11.526	13.000	0,3%	0,3%	0,3%
Valle d'Aosta	765	2.630	7.509	8.000	0,2%	0,2%	0,2%
Molise	974	2.588	7.309	8.000	0,3%	0,2%	0,2%

– Popolazione straniera residente ai Censimenti 1991 e 2001, al 31 dicembre 2008 e al 31 dicembre 2009, per regione

Secondo dati ISTAT 2008 solo in Veneto ci sono 403.985 immigrati stranieri di cui il 28% di origine Africana (di questi il 25% trattasi di bambini) inoltre il Veneto è la seconda regione dopo l’Emilia Romagna con il più alto numero di adozioni internazionali. A questi bambini non viene fatto a tutti lo screening e

potrebbero arrivare improvvisamente in ospedale con crisi da Anemia Falciforme. Inoltre barriere linguistiche e socio-culturali limitano l'accesso alle cure dei pazienti immigrati sia per quanto riguarda le cure routinarie e di assistenza che per le emergenze. A Padova presso l'Oncoematologia Pediatrica il numero di pazienti che ha ricevuto conferma di diagnosi di Anemia Falciforme dal 2006 al 2010 è duplicato come evidenzia tabella sottostante (Colombatti R. et al., 2008)



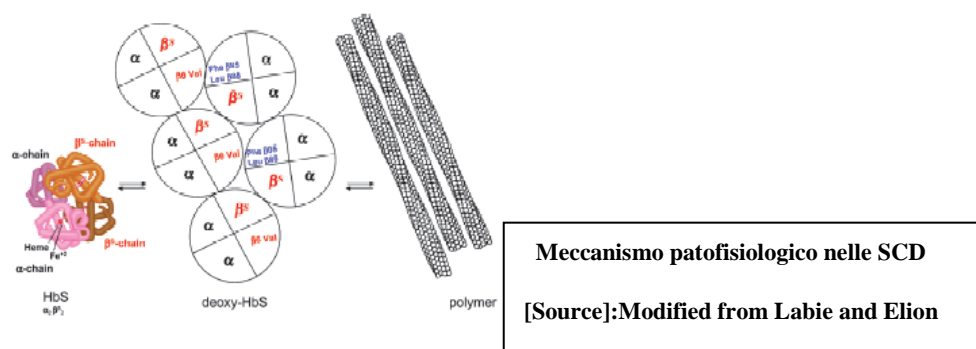
Nuovi pazienti con AF per anno: dati Oncoematologia Padova (Colombatti R. et al.,2008)

Il Centro Esperto di Anemia Falciforme di Padova grazie ad un progetto di ricerca finanziato dal Città della Speranza lavora ormai da anni per affrontare l'impatto di tale patologia sotto i suoi molteplici aspetti. Si promuovono progetti di studio e ricerca multidisciplinare. Dal 2010 partecipa allo studio "Sickle Cell Anemia Transcranial Study" (SCATES): studio multicentrico educativo sull'utilizzo del TCD nei bambini con drepanocitosi. Un team multidisciplinare è coinvolto nella diagnosi, cura e assistenza di questi pazienti.

1.1.3 Eziopatogenesi

L'emoglobina S, è la più diffusa variante emoglobinica nel mondo e la prima ad essere stata descritta. Dal punto di vista patogenetico è una malattia monogenica dovuta alla mutazione di un singolo gene è caratterizzata da una mutazione puntiforme GAG→GTG nel sesto codone del gene β-globinico che comporta la sostituzione amminoacidica β6 acido glutammico→valina nella

catena della beta globina. Questa variazione strutturale modifica la carica superficiale dell'emoglobina provocando, in situazioni di deossigenazione, la formazione di grossi polimeri di HbS. La formazione di microtubuli costituiti da singole molecole emoglobiniche attaccate l'una all'altra creano una struttura filamentosa elicoidale "tattoidi": queste cellule sono in grado di deformare l'eritrocita facendogli assumere la caratteristica forma a "falce" favorendo le "crisi" vaso-occlusive ed emolitiche proprie della malattia (Gastoldi G. et al.,2001). La falcizzazione dell'eritrocita si determina in particolari condizioni di ipossia, incremento dell'acidità, abbassamento della temperatura: diventa rigido va incontro ad una precoce distruzione ed è il processo che porta all'emolisi ed all'anemia.



L'altro meccanismo fisiopatologico importante è l'occlusione dei vasi sanguigni con conseguente ischemia e progressiva perdita funzionale d'organo.

Il processo che porta alle crisi vaso occlusive implica la disidratazione dei globuli rossi e le sue proprietà anomale di adesione all'endotelio vascolare (Kato GJ et al.,2009).

Una cascata di eventi patofisiologici portano ad alterazioni del tono vascolare e del metabolismo dell'Ossido Nitrico (Wagner MC. et al.,2004; Odièvre MH et. al., 2011).

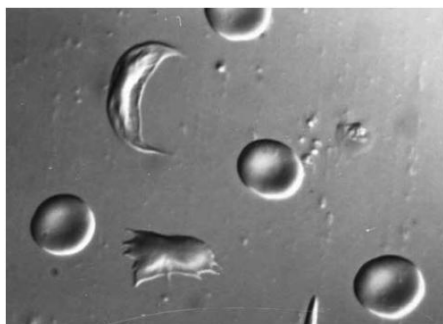
La gravità delle manifestazioni del gene falciforme è in parte associata all'aplotipo in cui è presente la mutazione: aplotipo Centro Africa e Benin presentano il quadro più severo, l'aplotipo Senegal moderato e Arabico-Indiano il più lieve (Miller ST. et. al.,2000). La Sindrome a Cellule Falciformi con manifestazione sintomatica include 4 genotipi: Anemia a Cellule Falciforme propriamente detta (HbSS) e forme composte di doppia eterozigosi: HbS/C; le

β thalassemie o microdrepanocitosi: $HbS\beta^0$, $HbS\beta^+$ e $HbSa^+$ causate invece da alterazioni genetiche che annullano la produzione di beta globina.

1.1.4 Diagnosi

La diagnosi di Anemia Falciforme comprende il test di falcizzazione e l'elettroforesi dell'emoglobina (Daniel Y., 2004). Quest'ultima viene eseguita su gel a pH acido e alcalino, permette di individuare le varianti emoglobiniche presenti.

Mentre HPLC (High Performance Liquid Chromatography) consente la loro quantificazione ed è diventato l'esame principale di screening in molti laboratori. La presenza di HbS superiore al 60% viene generalmente accettata come omozigosi HbS/HbS. Questo test consente anche di individuare gli eterozigoti e di conseguenza di attuare programmi di consulenza prenatale (Associazione Italiana Ematologia Oncologica Pediatrica AIEOP).



Esempio di falcizzazione su un campione di portatore eterozigote di emoglobina S e di β -talassemia. Fotografia della reazione con metabisolfito. Si noti un'emazia a falce spontanea, una prodotta con reazione di metabisolfito ed emazie ancora normali. (Da review Anemia a cellule falciformi e sindromi correlate:aggiornamenti e prospettive-Biochimica Clinica 2010)

1.1.5 Clinica

L'Anemia Falciforme è una malattia genetica autosomica recessiva.

Le manifestazioni cliniche dipendono principalmente dalla *vaso-occlusione* dalla *falcizzazione* dei globuli rossi e dalla *suscettibilità alle infezioni*. Pur essendo malattia monogenica, si comporta come una malattia multigenica, con un'espressività fenotipica estremamente variabile. Alcuni pazienti presentano tutte le possibili complicanze acute, altri arrivano all'età adulta solo con qualche moderata alterazione dei parametri ematochimici (Steinberg MH.,2005)

Manifestazioni Cliniche Importanti nella SCD durante l'infanzia e
adolescenza (AAP,2002):

Manifestazioni Acute

Sepsi batterica o Meningite*

Crisi dolorose vaso-occlusive ricorrenti (dattilite, muscoloscheletriche,
dolore addominale)

Sequestro splenico*

Crisi Aplastiche*

Sindrome Toracica Acuta*

Ictus*/Attacco Ischemico Transitorio (TIA)

Priapismo

Ematuria (compresa la Necrosi Papillare)

Manifestazioni Croniche

Anemia

Ittero

Splenomegalia; Asplenia Funzionale

Cardiomegalia e Soffi funzionali

Ipostenuria ed Enuresi Proteinuria

Colelitiasi

Ritardo di crescita e di sviluppo puberale

Malattia Restrittiva Polmonare*

Ipertensione Polmonare*

Necrosi Asettica dell'Osso

Retinopatie proliferativa

Ulcere agli arti inferiori

Emosiderosi da trasfusione*

:

**cause potenziali di mortalità*

Si tratta dunque di una malattia cronica che però ha delle manifestazioni acute, alcune delle quali potenzialmente letali. Ogni paziente ha un suo "steady state" (clinico, laboratoristico ecc) che necessita di una gestione continuativa e non solo in acuto. E' una patologia multiorgano ma gli organi più colpiti sono quelli dove il flusso di sangue è più lento e quindi dove più facilmente si può avere mancanza di ossigeno: ossa, fegato, rene, milza, polmone; o in quelli dove c'è più bisogno di ossigeno: midollo osseo, muscoli e **cervello**.

Gli etrozigoti (A/S) in condizioni normali non manifestano sintomi; tuttavia possono rilevare la loro condizione solo in particolari circostanze di ipossia come ad esempio in alta quota (Paleari R. et. al.,2010).

1.1.6 Assistenza al paziente con Anemia Falciforme

Il primo gruppo di coordinamento della ricerca clinica nell'ambito dell'anemia falciforme è stato il Cooperative Study for Sickle Cell Disease (CSSCD) formato nel 1977 negli Stati Uniti, che ha fatto luce sulla storia naturale della malattia, la disfunzione d'organo, gli eventi acuti, i parametri di laboratorio ed è stato la base per sviluppare trials clinici (Vichinsky EP.,1982; Gaston MH, 2005). Programmi Nazionali (Sickle Cell Public Health Programs) e Interesse Globale (Comprehensive Care Programs) alla cura dei pazienti con SCD nei paesi in cui da più tempo il peso socio-economico di questa malattia è presente (Stati Uniti, Gran Bretagna, Jamaica, Francia) hanno permesso di ridurre l'elevata mortalità di questi bambini nei primi tre anni di vita (Leiken SL.et al.,1989; AAP Newborn Screening Taskforce 2000). Lo screening neonatale in atto in questi paesi permette di individuare i soggetti a rischio ed intraprendere le adeguate cure terapeutiche (Pass KA. et al.,2000). Secondo linee guida americane ed inglesi, sono anche stati definiti i 3 minimi standard assistenziali che devono essere garantiti: tutti i pazienti affetti da Anemia Falciforme devono:

1. iniziare la profilassi antibiotica dai due mesi di vita.
2. sottoporsi alle vaccinazioni (in particolare pneumococco)
3. sottoporsi all'esame Doppler Transcranico dall'età di due anni per l'individuazione dei pazienti a elevato rischio Stroke.

www.screening.uk/sickleandthal).

1.1.7 Terapia

L'obiettivo è mantenere il valore di emoglobina HbA > il 50%.

La Terapia si avvale essenzialmente di provvedimenti tesi a prevenire le crisi vaso-occlusive mediante il mantenimento di una buona idratazione del paziente.

Le crisi dolorose possono essere scatenate da:

- infezioni
- febbre elevata
- perdita di grandi quantità di liquidi

- chetosi comunemente detto "acetone"
- soggiorno in alta montagna
- freddo
- intensa fatica
- traumi
- uso di farmaci diuretici ed anestetici

Le crisi richiedono somministrazione di terapia analgesica, antinfiammatoria fino a ricorrere in casi non responsivi all'uso di oppiacei.

La terapia trasfusionale rappresenta un cardine nel trattamento della SCD (Josephson CD. et.al.,2007):

1. migliora l'ossigenazione tissutale aumentando il valore assoluto di Hb (singola trasfusione)
2. riduce la viscosità ematica ed aumenta l'ossigenazione riducendo il valore di HbS (eritrocitoferesi o EEX o terapia trasfusionale cronica).

L'EEX ha lo scopo di ridurre HbS < 30% ma mantenere i valori di Hb a 10 g/dl. Il regime di EEX viene sempre più frequentemente usato per prevenire il sovraccarico di ferro (Swerdlow PS.et.al.2006). Indicata in caso di sequestro splenico, prevenzione dello stroke, riduzione della frequenza di crisi vaso occlusive.

L'Idrossiurea (HU) ha un effetto pleiotropico: oltre ad indurre la produzione di HbF, induce anche importanti variazioni a livello cellulare: ad esempio la deformabilità delle cellule HbS, migliora il flusso ematico e riduce l'adesione endoteliale (Ballas SK.et.al., 1989; Charache S. et. al., 1996). Inoltre potrebbe avere anche un effetto sulla prevenzione dello stroke facendo diminuire la velocità di flusso al TCD (Gulbis B .et.al.,2005; Zimmeman SA. et.al., 2007).

La terapia con HU viene usata anche in caso di Sindrome Polmonare Acuta (Acute Chest Syndrome ACS) e ipertensione polmonare (Gladwin MT. et.al., 2004).

Il trapianto di midollo osseo (TMO) allogenico da donatore familiare è il solo trattamento curativo per la Drepanocitosi (Bolanos-Meade J.et.al., 2009). Tuttavia la scelta di sottoporre a trapianto di midollo un bambino può essere particolarmente difficile visto che la stessa malattia non espone ad un immediato pericolo di vita (raccomandazioni AIEOP).

1.2 COMPLICANZE NEUROLOGICHE

Gli **Attacchi Ischemici Transitori (TIA)** sono deficit neurologici ad insorgenza improvvisa della durata inferiore alle 24 ore. Quando si instaura un quadro di ipossia cerebrale, può manifestarsi con quadri clinici diversi a seconda della regione anatomica interessata: amaurosi, emiparesi sensitivo-motoria, afasia, atassia, vertigini, deficit nervi cranici ecc. Il TIA è un forte fattore predittivo per l'ictus nell'anemia falciforme (Ohene-Frempong K 1998). Spesso la diagnosi nei bambini piccoli risulta difficile soprattutto quando episodi dolorosi possono mimare un deficit motorio, o quando trattandosi di pazienti immigrati hanno già difficoltà linguistiche. E' dunque indispensabile in caso di sospetto documentare il quadro con dati di RMN e ridurre la percentuale di HbS al di sotto del 30% dell'emoglobina totale.

Una familiarità per lo stroke è stata confermata da studi effettuati in fratelli con Anemia Falciforme (Driscoll MC et al. 2003)

Lo **stroke** è un evento acuto dovuto ad un'occlusione vascolare di una delle arterie del circolo di Willis in cui i segni neurologici durano più di 24 ore e il deficit è riferibile al territorio di perfusione dell'arteria interessata con comparsa di una lesione ischemica al test di neuroimaging. I deficits si presentano spesso con segni e sintomi focali, soprattutto emiparesi, disturbi sensoriali, convulsioni e disturbi della vista (Ohene-Frempong K 1991)

Le arterie più frequentemente interessate sono l'Arteria Cerebrale Media, il tratto terminale dell'Arteria Carotide Interna e l'Arteria Cerebrale Anteriore.

Il circolo posteriore o vertebro basilare è meno frequentemente interessato. Ma quando una severa occlusione accade, più vasi collaterali si possono attivare in risposta all'ischemia cronica apportando nuovo flusso di sangue alle aree più ipoperfuse dando origine a una Sindrome Moya-Moya (Gosalakkal JA., 2002; Dobson SR. et.al., 2002). Inizialmente queste collaterali tributarie appaiono a livello del tratto distale dell'Arteria Carotide Interna, poi coinvolgono le Arterie Cerebrali Medie e negli stati successivi anche le Arterie Cerebrali Posteriori e Arteria Basilare (Zimmerman RA., 2005). Tali alterazioni comportano la formazione di microaneurismi con rischio di sanguinamento (Smith JL 2009). Pazienti che sviluppano Sindrome Moya-Moya hanno aumentato rischio di stroke ricorrenti anche in regime trasfusionale. Spesso questo è causa di uno stroke emorragico che risulta fatale nel 26% dei casi (Ohene-Frempong K et al. 1998).

Ma la più precoce e frequente complicanza neurologica nei bambini affetti da Anemia Falciforme è data dalla frequente presenza di Infarti Clinicamente Silenti che spesso sfuggono alla diagnosi perché apparentemente asintomatici (Miller ST, et.al.,2001). La distribuzione delle lesioni alla RMN interessa prevalentemente le regioni frontoparietali e periventricolari della sostanza bianca (Kwiarkowski JL.et.al., 2009). L'infarto silente (I.S.) può essere causa in un bambino di età scolare di difficoltà di apprendimento e compromettere le funzioni psico-cognitive (Krejza J.et.al. 2010). Il TCD alterato non necessariamente correla con la presenza o meno di Infarti Silenti (Pegelow CH et al. 2001). Bambini molto piccoli di 3-9 mesi affetti da A.F. sono ad alto rischio di sviluppare deficit cognitivi e ritardo nello sviluppo neurologico (Hogan AM et al.,2005).

1.2.1 Uso TCD nel predire le complicanze neurologiche e studio STOP

Valutare nel tempo le velocità emodinamiche delle arterie intracraniche in modo non invasivo, semplice e ben tollerato, si è dimostrato essere un notevole supporto diagnostico e preventivo nello screening dei piccoli pazienti a rischio stroke.

Aaslid nel 1982 dimostrò l'efficacia del TCD nei pazienti che presentavano vasospasmo cerebrale (Aaslid 1982).

Da allora vari studi sono stati fatti per verificarne la validità a scopo preventivo nei bambini affetti da Anemia Falciforme (Adams RJ.et.al., 1992, 1997)

Questi studi hanno permesso di raccogliere i seguenti dati:

- La velocità normale dell'arteria cerebrale media studiata in bambini sani è di circa 90 cm/s.
- La velocità dell'arteria cerebrale media in bambini affetti da SCD, senza progressi ictus è di circa 130 cm/s.
- Quando l'Angio-RM mostrava gravi stenosi in bambini con SCD la velocità a livello dell'arteria cerebrale media era sempre superiore a 190 cm/s.

Il Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD) è stato il primo gruppo collaborativo e di Coordinamento avviato nel 1977 negli Stati Uniti a far luce sulla storia naturale della malattia. Furono arruolati ca. 4000 partecipanti dalla

nascita (2 mesi) fino all'età adulta al fine di individuare i fattori che contribuiscono alla morbilità e la mortalità della malattia (Gaston MH, 1982).

Successivamente lo studio STOP (Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia) è stato condotto dal 1995 al 2000 in 14 siti tra Stati Uniti e Canada (Adams RJ.et.al.,2005). Circa 2000 bambini affetti da Anemia Falciforme dai 2 ai 16 anni senza precedenti ictus sono stati studiati con il TCD per studiare la velocità dell'Arteria Cerebrale Media e del tratto distale dell'Arteria Carotide Interna. Per eseguire questo studio è stato eseguito un esame TCD rigoroso, con protocolli standardizzati e attrezzature atte a garantire l'uniformità del test. Lo studio è stato interrotto prematuramente all'evidenza che la regolare terapia trasfusionale in soggetti che presentavano elevate velocità al TCD riduceva del 90% il rischio di stroke. (Adams R.J. et.al., 2005; Lee MT.et.al.,2006).

Un secondo studio (**STOP II** 2000-2005) (Adams RJ.et.al.,STOP2,2005) seguì il precedente per determinare una volta iniziata la terapia trasfusionale per quanto questa dovesse protrarsi nel tempo. Vennero raccolti 100 bambini affetti da drepanocitosi, tutti con velocità alterate al TCD, che dopo le trasfusioni scendevano ad un valore uguale o inferiore a 170 cm/s. Questi bambini avevano eseguito trasfusioni per almeno trenta mesi. Metà di questi bambini continuavano la terapia trasfusionale, mentre l'altra metà la sospendevano. Anche questo studio venne interrotto anticipatamente per motivi etici, quando venne rilevato che la sospensione delle trasfusioni riportava in poco tempo i valori a velocità elevate ed aumentava il rischio di stroke. Vennero quindi introdotti degli specifici parametri emodinamici Doppler delle arterie intracraniche che sulla base delle velocità ematiche codificavano il grado di stenosi e il conseguente rischio elevato di stroke. Le velocità ematiche rilevate all'esame Doppler transcranico (TCD) erano valutate a livello dell'Arteria Cerebrale Media e veniva considerata la TAMMv (Time Average Mean Maximum Velocity) che secondo Aaslid era la velocità ematica delle arterie intracraniche che meglio si rapportava al flusso ematico cerebrale (CBF). Secondo queste indicazioni le velocità ematiche rilevate al TCD a livello dell'Arteria Cerebrale Media (ACM) erano considerate **normal** quando la TAMM era inferiore a 170 cm/s, erano considerate **conditional** quando il valore della TAMM oscillava tra i 170 cm/s e i 200 cm/s, ed erano considerate **abnormal** quando il valore della TAMM era maggiore di 200 cm/s.

NORMAL	TAMM < 170 cm/s
CONDITIONAL	TAMM 170 - 190 cm/s
ABNORMAL	TAMM > 200 cm/s

Classificazione elaborata dagli studi STOP

Lo studio STOP ha rilevato che una TAMM a livello dell'arteria cerebrale media > 200 cm/s aumenta il rischio di stroke nei bambini portatori di drepanocitosi fino ad un valore pari al 10% per anno. Successivi studi sono stati fatti per valutare se altre arterie possono essere interessate nel rischio di stroke e se il cut off stabilito da STOP poteva andar bene. Valori velocitometrici di TAMM \geq a 170 cm/s registrati a livello dell'Arteria Cerebrale Anteriore sono associati ad un elevato rischio di Stroke (Kwiatkowski J. et.al., 2006). Inoltre l'utilizzo sempre più frequente del Eco Color Doppler Transcranico (TCCS) ha richiesto una valutazione di comparazione per determinare se i criteri per lo screening di pazienti con anemia falciforme (studio STOP) determinati dall'uso di una tecnica US di non imaging come TCD, potessero essere applicati a studi effettuati con tecnica US imaging come TCCS (Jones AM. et.al.,2001; Neish AS. et.al.,2002; McMarville MB. et.al., 2004). Alla base di questi studi, si è potuto verificare che i valori del TCCS risultavano inferiori del 15-20% rispetto ai valori TCD. Secondo indicazioni dallo STOP, il cut off per il TCCS viene dunque adottato come da tabella sottostante.

NORMAL	TAMM < 155 cm/s
CONDITIONAL	TAMM 155 - 179 cm/s
ABNORMAL	TAMM \geq 180 cm/s

Criteri per TCCS (STOP)

Tutti i valori velocitometrici vanno campionati senza la correzione angolare per renderli più omogenei con quelli raccolti con il TCD (Krejza J. et al.,2001; Krejza J. et al.,2007). Linee Guida SPREAD (Stroke Prevention and Educational Awareness Diffusion) raccomandano l'uso del TCD a tutti i pazienti affetti da

Anemia Falciforme dai 2 ai 16 anni come prevenzione dell'ictus
(raccomandazione Tipo A Classe 1).

2 SCOPO DELLA RICERCA

Nell'ambito della Drepanocitosi molto è stato scritto ma molto resta ancora da chiarire. Lo scopo della ricerca è stato quello di analizzare i vari aspetti del problema della gestione del paziente con drepanocitosi. La valutazione del rischio di stroke, di infarti silenti e dell'eventuale compromissione di tipo cognitivo, implicano necessariamente un approccio multidisciplinare dello studio. Poiché molti centri sono ormai dotati di TCCS, la prima fase dello studio è stata dedicata al confronto fra le due metodiche neurosonologiche (TCCS e TCD): è stata condotta una analisi cross sectional e di follow up in un gruppo di bambini in cui ambedue le metodiche erano state utilizzate.

Nella seconda fase ci si è proposto di valutare l'ipotesi che l'associazione dei risultati ottenuti al Doppler e alla Angio-RMN potesse identificare i bambini che sviluppavano IS rispetto a quelli che non lo sviluppavano.

Nella terza fase si sono valutate le performance cognitive dei bambini con e senza IS.

Infine la quarta fase si è posta come obiettivo di valutare eventuali differenze nel gruppo con e senza I.S., da un punto di vista neurofisiologico, attraverso l'analisi LORETA della P300, e da un punto di vista della quantificazione del volume e dello spessore della corteccia e della quantità della sostanza bianca attraverso il software Free Surfer.

Il presente studio si inquadra in un ampio progetto denominato "SCATES" (Studio Multicentrico Osservazionale Clinico ed Educazionale sullo screening con TCD (Doppler Transcranico) nella Drepanocitosi (SCD) e Studi Ancillari. E' stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova in data 08.02.2010 protocollo n°2012p. I genitori dei piccoli pazienti hanno firmato un consenso informato dopo un'adeguata presentazione degli obiettivi e delle indagini previste (esame pediatrico, tests ematochimici, questionario sulla qualità del sonno, registrazione esame TCD, RMN, Tests Neuropsicologici e Neurofisiologici).

Tutti i dati sono trattati secondo le norme vigenti per la garanzia della privacy (Codice in materia di protezione dati personali. D.L. 30 giugno 2003, n.196).

3 CONFRONTO TCD e TCCS

3.1 MATERIALI E METODI

Dal novembre 2009 a dicembre 2011 è stato eseguito screening su 82 bambini (M=39 F=43) di età media pari a 8.2 ± 4.1 anni (range: 2 – 18 anni). L'età media delle femmine era di 7.8 ± 3.7 anni, quella dei maschi di 8.6 ± 4.4 : tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.35$). Degli 82 bambini, 68 erano HbS/S, 9 HbS/C e 5 HbS/ β Thal.

16 pazienti sono in trattamento trasfusionale terapeutico; 5 hanno effettuato trasfusioni occasionali in seguito ad *Acute Chest Sindrom* (ACS); 4 sono stati recentemente sottoposti a Trapianto di Midollo Osseo (TMO) da fratelli HLA compatibili.

Tutti i parametri sono stati valutati sia per il TCCS che per il TCD su quattro tratti (M1-M4) dell'arteria cerebrale media (ACM) destra e sinistra. A tutti i bambini è stato eseguito lo studio morfologico ed emodinamico delle arterie intracraniche del Willis con un Ecotomografo Doppler TOSHIBA Aplio XG (TCCS) con e senza correzione angolare. Nella stessa seduta e dallo stesso operatore, le arterie sono state poi rivalutate emodinamicamente con un Doppler Transcranico (TCD) Viasys Hethcare Sonara. La durata media dei tests è stata di ca. 30 min. Tutti i bambini hanno tollerato efficacemente la prova. Maggior difficoltà di esecuzione si è presentata con bambini più piccoli per minor compliance.

3.1.1 Basi teoriche del Doppler

Il principio che sta alla base delle due metodiche, TCCS e TCD, è l'utilizzo degli Ultrasuoni e l'effetto Doppler. L'immagine ecotomografica TCCS è il risultato di una serie di impulsi ultrasonografici emessi dal trasduttore (sonda) e regolati da un timer che ne controlla la durata e la frequenza. Il trasduttore trasforma gli echi riflessi nel tempo che provengono da varie strutture incontrate in impulsi elettrici, questi vengono inviati al ricevitore e all'amplificatore. Gli echi riflessi concorrono a formare una mappa bidimensionale delle strutture secondo i piani di scansione dandone l'immagine ecografica come imaging B-mode definita secondo la brillantezza

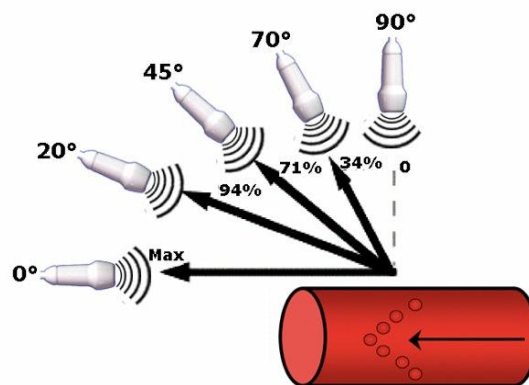
(Brightness) nella scala dei grigi. Il segnale riflesso ricevuto TCD può essere analizzato, oltre che rispetto all'intensità anche al contenuto in frequenza che differisce da quella originariamente emessa. Nel nostro caso i globuli rossi all'interno del vaso rappresentano la superficie riflessa. La differenza di frequenza è in grado di evidenziare le parti in movimento, la loro direzione e la loro velocità (Doppler CA,1842). La differenza di frequenza (Δf) tra fascio incidente e fascio riflesso è dunque proporzionale sia alla velocità del flusso sanguigno che all'angolo di incidenza del fascio trasmesso:

$$\Delta f = \frac{2 \cdot f_o \cdot v \cdot \cos(\emptyset)}{c}$$

La frequenza Doppler (Δf) dipende da:

- f_o Valore medio della frequenza di emissione (Hz)
- c Velocità del suono nei tessuti (cm/s)
- \emptyset Coseno dell'angolo fra il trasduttore e la direzione del flusso ematico
- v Velocità del flusso ematico (cm/s)

Dalla formula è intuitivo rilevare che se l'angolo è pari a 0° (cioè la direzione degli US è parallela al flusso) il coseno sarà 1 e quindi la velocità calcolata sarà fedele alla reale. Man mano che l'angolo aumenta si riduce la stima delle velocità.



variazione del Doppler shift in funzione del coseno dell'angolo di incidenza.

La frequenza degli impulsi (PRF) è determinante nel potere di risoluzione della massima velocità rilevabile del flusso: maggiore è la PRF maggiore sarà la velocità calcolabile. Per riuscire a rilevare il segnale delle arterie intracraniche

bisogna utilizzare sonde settoriali a bassa frequenza (1,5-2 MHz) con piccola superficie di appoggio: favoriscono meglio la penetrazione degli US all'interno del cranio ed hanno una appropriata profondità di campo fino a 9-10 cm: da piani superficiali a circolo di Willis e Arteria Basilare. L'osso e l'aria non consentono la propagazione degli US: l'uno per l'alto contenuto di calcio attenua molto il segnale, l'aria invece è un grande isolante acustico. Per questo motivo nello studio delle arterie del circolo di Willis si utilizzano solo particolari finestre che consentano il passaggio degli US attraverso la teca cranica. Tra sonda e cute si interpone del gel per ridurre l'impedenza dell'aria.

Sicurezza US

Sebbene non si sia a conoscenza di controindicazioni provenienti dalle trasmissioni US per Doppler diagnostici entro i livelli approvati da FDA (Food and Drug Administration), le onde US dissipano energia sotto forma di calore e possono causare riscaldamento dei tessuti.

E' importante dunque adottare particolari attenzioni:

1. Ridurre la potenza (riduzione dell'ampiezza degli impulsi)
2. Ridurre la lunghezza del volume campione in mm (comporta riduzione dell'ampiezza degli impulsi di conseguenza meno energia trasmessa nel corpo)
3. Aumentare la Scala in KHz (è un riflesso della PRF) ha effetto diretto sulla profondità di penetrazione. Comporta una riduzione di impulsi trasmessi e meno energia trasmessa al corpo.
4. Adottare principio ALARA (As Low As Reasonably Achievable) mantenere la durata del test il minimo possibile garantendo comunque una buona diagnosi clinica.

3.1.2 TCD

Il TCD è una metodica che permette di valutare l'emodinamica del circolo intracranico tramite l'effetto Doppler (Doppler CA 1842).

Utilizzando la metodica TCD, non avendo la ricostruzione visiva di ciò che si analizza è stato necessario misurare il diametro bitemporale del cranio del bambino in modo da poter calcolare la profondità di insonorizzazione di ogni singola arteria cercando di ridurre l'errore (come tabella sottostante).

Transtemporal Head Diameter	MCA-1 ^a	MCA	ICA Bifurcation	ACA	PCA	TOB
12 cm	30-36	30-54	50-54	50-58	40-60	60
13 cm	30-36	30-58	52-58	52-62	42-66	65
14 cm	34-40	34-62	56-64	56-68	46-70	70
15 cm	40-46	40-66	56-66	56-72	50-70	75

MCA = middle cerebral artery, ICA = internal carotid artery, ACA = anterior cerebral artery, PCA = posterior cerebral artery, TOB = top of the basilar. As a rough guide, the TOB lies at the midline and the ICA bifurcation is in general about 10 mm shallower than the TOB.
a. MCA-1 is shallowest depth at which the MCA can be recorded.

Profondità in mm delle arterie per differenti diametri cranici (STOP)

Le arterie sono state quindi identificate in base:

- angolazione della sonda
- direzione del flusso
- profondità del volume campione
- riconoscimento di segnali bidirezionali: indice sovrapposizione dell'Arteria Cerebrale Media (in avvicinamento) e Arteria Cerebrale Anteriore (in allontanamento)

Le finestre utilizzate in questo studio sono state:

La Finestra **Transtemporale** che permette lo studio delle velocità ematiche delle Arterie Cerebrali Medie (ACM), delle Arterie Cerebrali Anteriori (ACA), dei tratti terminali delle Arterie Carotidi Interne (TICA), dei tratti precomunicanti e post-comunicanti P1-P2 delle Arterie Cerebrali Posteriori (ACP)

La Finestra **Suboccipitale** ha permesso lo studio dei tratti V3-V4 delle Arterie Vertebrali (AV) e dell'Arteria Basilare (AB).

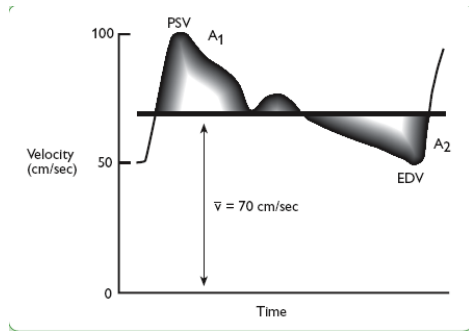
Sono stati campionati 4 tratti dell'Arteria Cerebrale Media con incremento di 2 mm lungo il suo decorso ottimizzando il segnale alla più alta frequenza udibile.

Da questa frequenza rielaborata attraverso sistemi computerizzati che utilizzano la Trasformata di Fourier si ottiene il contenuto spettrale del segnale Doppler dal quale è possibile calcolare i parametri di interesse:

- ♣ il picco sistolico (Vmax, PEAK)
- ♣ la velocità diastolica (Ved, EDV)
- ♣ la media delle massime velocità (TAMM)

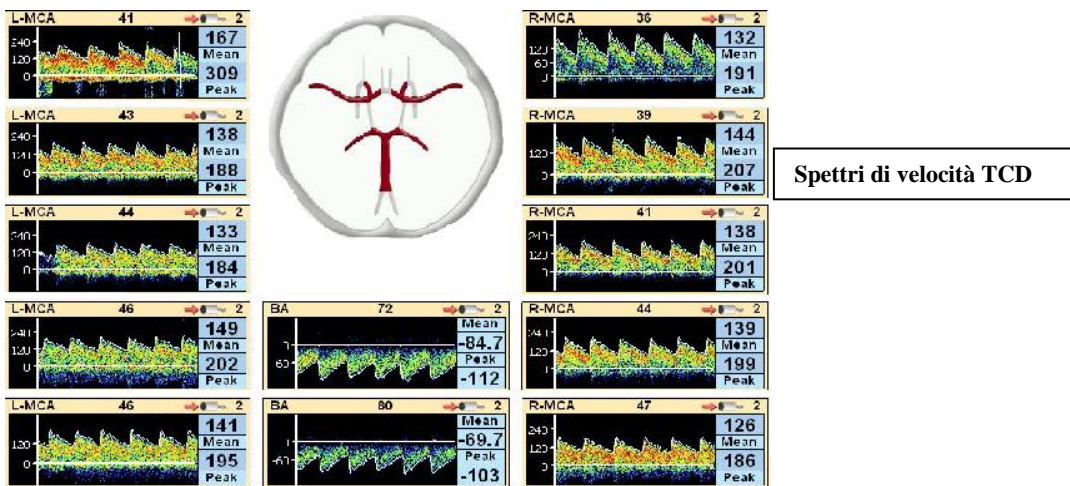
♣ l'indice di pulsatilità (PI)

La velocità considerata è stata la TAMMv (Time-Averaging Mean Maximum Velocities): velocità che dipende meno da fattori sistemici come frequenza cardiaca, contrattilità e resistenze periferiche (figura sottostante, Aaslid R., 1982).



La linea che caratterizza la TAMM è posizionata in modo tale che l'area A1 sia uguale all'area A2 (STOP)

Tutti i pazienti sono stati esaminati in posizione supina in ambiente confortevole cercando di mantenerli svegli e collaboranti. Il sonno inducendo un incremento di CO₂ può aumentare i valori velocitometrici. Altri fattori che possono incrementare la velocità di flusso possono essere: ridotto livello di ematocrito, febbre, ACS, Crisi anemica acuta, ipossia, ipoglicemia. Fattori che possono ridurre le velocità di flusso sono: trasfusioni e iperventilazione (IPN).



3.1.3. TCCS

Lo studio ecotomografico Doppler del circolo intracranico permette la visualizzazione diretta delle arterie della base cranica.

Le finestre utilizzate sono state le stesse del TCD.

In modalità B-mode sono state riconosciute le strutture parenchimali che sono considerate punti di repere:

la struttura iperecogena dell'ala dello sfenoide indica dove poter riconoscere l'Arteria Cerebrale Media (rosso) e l'Arteria Cerebrale Anteriore (blu).

La struttura a forma di “*farfalla*” che corrisponde al mesencefalo indica dove si evidenzia parte del circolo di Willis con le sue Arterie Cerebrali Posteriori nel loro tratto precomunicante P1 (rosso) e post-comunicante P2 (blu).

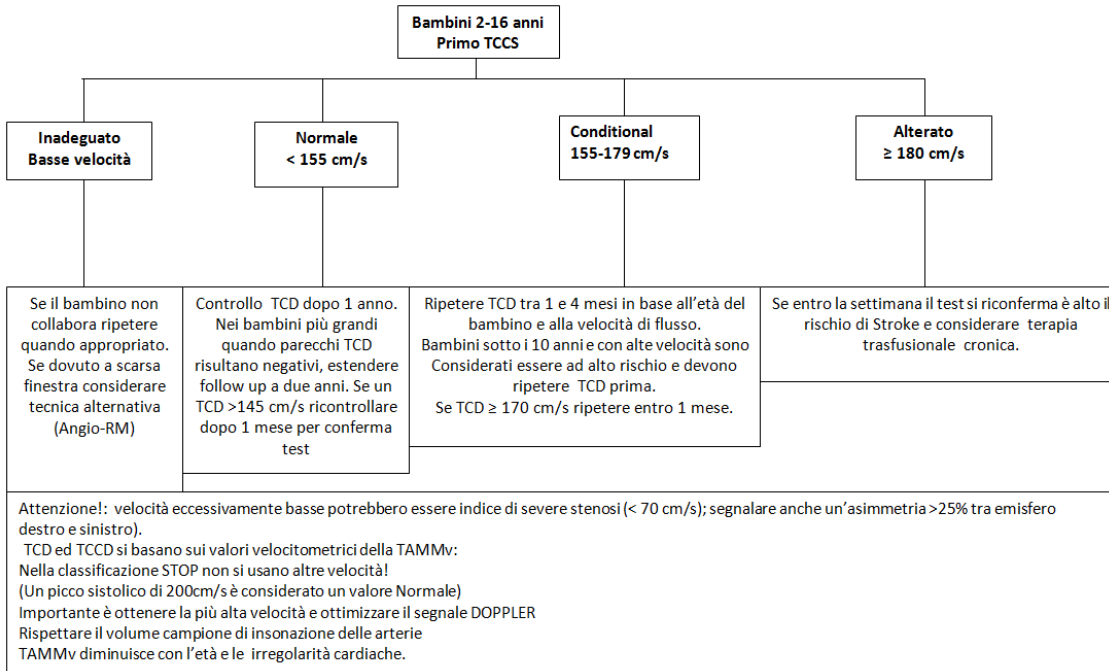
Ruotando la sonda di 90° portandosi sul piano coronale in modalità B-mode è stato riconosciuto il canale carotico entro il quale decorre l'Arteria Carotide Interna e campionare il suo segmento terminale (C1-2) o TICA con flusso in avvicinamento (rosso).

La finestra **suboccipitale** ci ha permesso di visualizzare le seguenti arterie: Arteria Vertebrale Destra, Arteria Vertebrale Sinistra e Arteria Basilare.

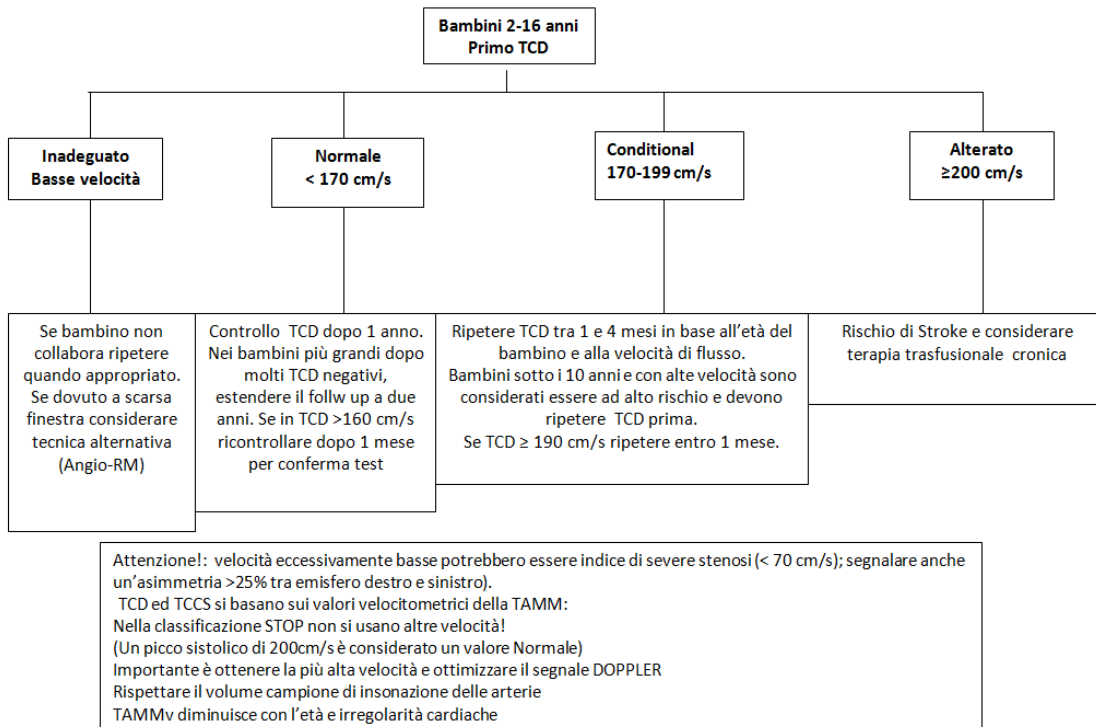
La sonda è stata orientata a livello suboccipitale e attraverso il forame magno è stata individuata in posizione mediana l'Arteria Basilare e lateralmente rispettivamente verso destra il tratto V4 dell'Arteria Vertebrale Destra e verso sinistra il tratto V4 dell'Arteria Vertebrale Sinistra.

La visualizzazione diretta delle arterie, permette di individuare il loro decorso anatomico e la direzione del flusso. Il TCCS consente inoltre di posizionare settorialmente il volume campione e la velocità può essere calcolata in modo più preciso eseguendo la correzione angolare. Il volume campione è stato settato a 3 mm. Le velocità ematiche sono state calcolate sia con la correzione angolare che senza correzione angolare (Krejza J. et al.,2001; Krejza J. et al.,2007). Per i criteri diagnostici e di follow up, ci si attiene dunque all'algoritmo proposto dallo studio STOP sia per quanto riguarda il TCD che per il TCCS. Rappresentazione grafica nelle seguenti tabelle.

CRITERI DIAGNOSTICI TCCS



CRITERI DIAGNOSTICI TCD



3.2 ANALISI STATISTICA

E' stato utilizzato il T di Student per campioni indipendenti e per misure ripetute. La regressione lineare semplice e multipla è stata utilizzata per valutare il grado di correlazione lineare fra una variabile dipendente e una o più variabili indipendenti rispettivamente. Per le variabili qualitative è stato utilizzato il Chi quadrato. Il livello di significatività predefinito è stato $p < 0.05$

3.3 RISULTATI

ACM destra

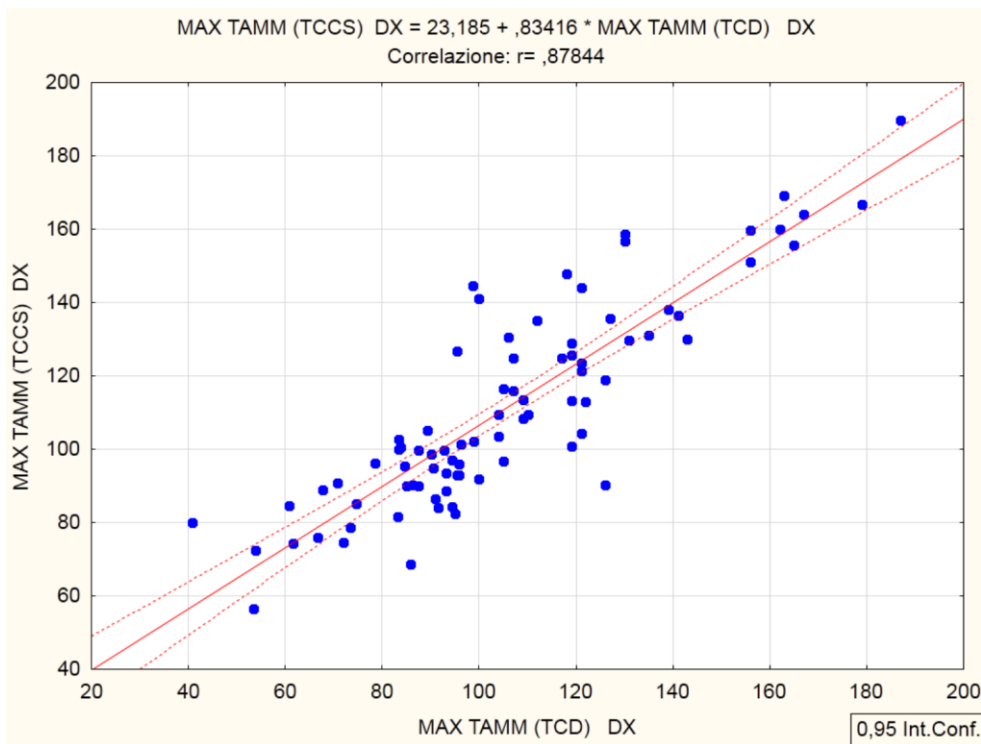
Per la ACM di destra, la massima Tamm per il TCCS senza correzione è stata trovata nel tratto M1 10 volte (12.2%), nel tratto M2 15 volte (18.3%), nel tratto M3 29 volte (35.4%) e nel tratto M4 28 volte (34.1%); per il TCD la massima Tamm è stata trovata nel tratto M1 13 volte (15.8%), nel tratto M2 24 volte (29.3%), nel tratto M3 28 volte (32.9%) e nel tratto M4 18 volte (22%).

La tabella seguente mostra la concordanza nel rilievo del valore massimo di Tamm fra TCCS non corretto e TCD.

	MAX TCCS	MAX Tamm TCD				Totali	%
		M1	M2	M3	M4		
Freq.	M1	2	3	2	3	10	12,20
Perc. Riga		20,00%	30,00%	20,00%	30,00%		
Freq.	M2	1	7	6	1	15	18,29
Perc. Riga		6,67%	46,67%	40,00%	6,67%		
Freq.	M3	6	8	7	8	29	35,37
Perc. Riga		20,69%	27,59%	24,14%	27,59%		
Freq.	M4	4	6	12	6	28	34,15
Perc. Riga		14,29%	21,43%	42,86%	21,43%		
Freq.	Tutti	13	24	27	18	82	
Perc. Riga		15,85	29,27	32,93	21,95		
Concordanza=		26,83					

Come si può notare le Tamm massime vengono riconosciute nello stesso tratto della ACM nel 26.8% dei casi (22 su 82).

La correlazione lineare fra i valori di Tamm massima rilevati al TCD e quelli rilevati al TCCS è stata pari a $r=0.88$, $p < 0.000001$. La figura sottostante mostra la correlazione.



ACM sinistra

Per la ACM di sinistra, la massima Tamm per il TCCS senza correzione è stata trovata nel tratto M1 8 volte (9.8%), nel tratto M2 20 volte (24.4%), nel tratto M3 30 volte (36.6%) e nel tratto M4 24 volte (29.2%); per il TCD la massima Tamm è stata trovata nel tratto M1 2 volte (2.4%), nel tratto M2 15 volte (18.3%), nel tratto M3 32 volte (39%) e nel tratto M4 33 volte (40.3%).

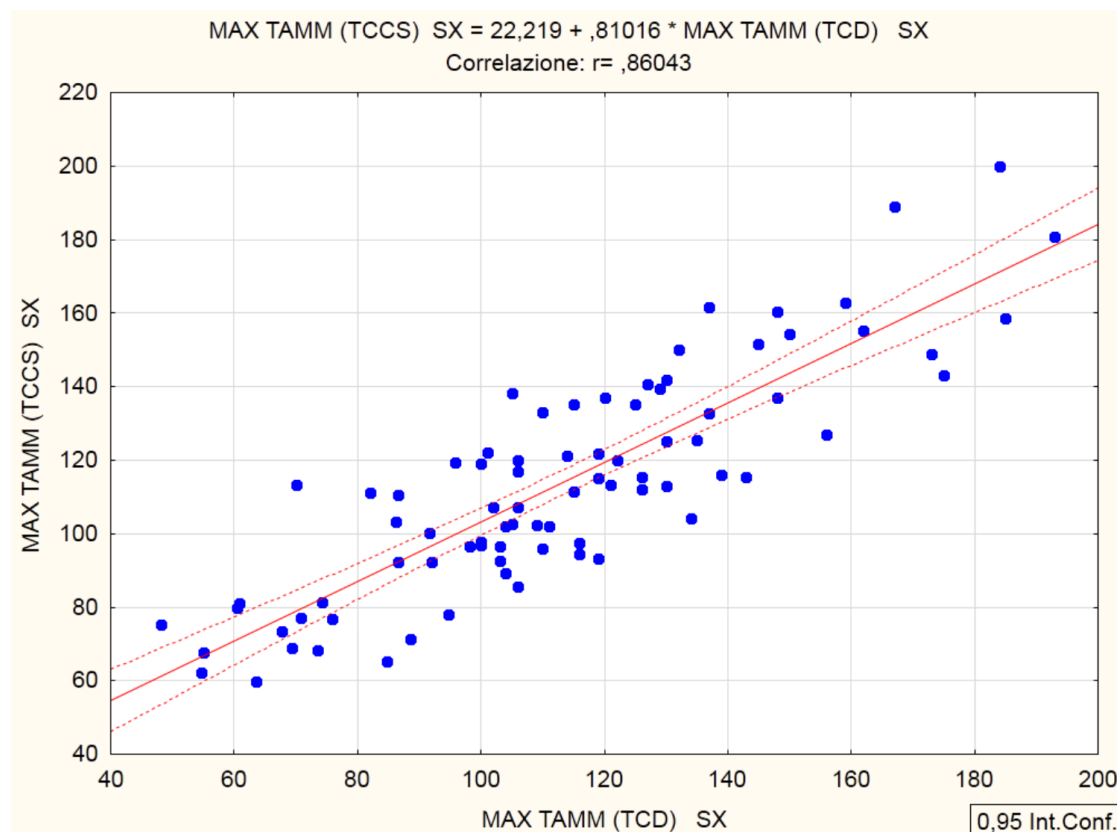
La tabella seguente mostra la concordanza nel rilievo del valore massimo di Tamm fra TCCS non corretto e TCD.

	MAX Tamm TCCS	MAX Tamm TCD				Totali	% Colonna
		M1	M2	M3	M4		
Freq.	M1	0	0	1	7	8	9,76
Perc. Riga		0,00%	0,00%	12,50%	87,50%		
Freq.	M2	0	5	11	4	20	24,39
Perc. Riga		0,00%	25,00%	55,00%	20,00%		
Freq.	M3	2	6	12	10	30	36,59
Perc. Riga		6,67%	20,00%	40,00%	33,33%		
Freq.	M4	0	4	8	12	24	29,27
Perc. Riga		0,00%	16,67%	33,33%	50,00%		
Freq.		2	15	32	33	82	
Perc. Riga		2,44	18,29	39,02	40,24		

Concordanza = 35,37

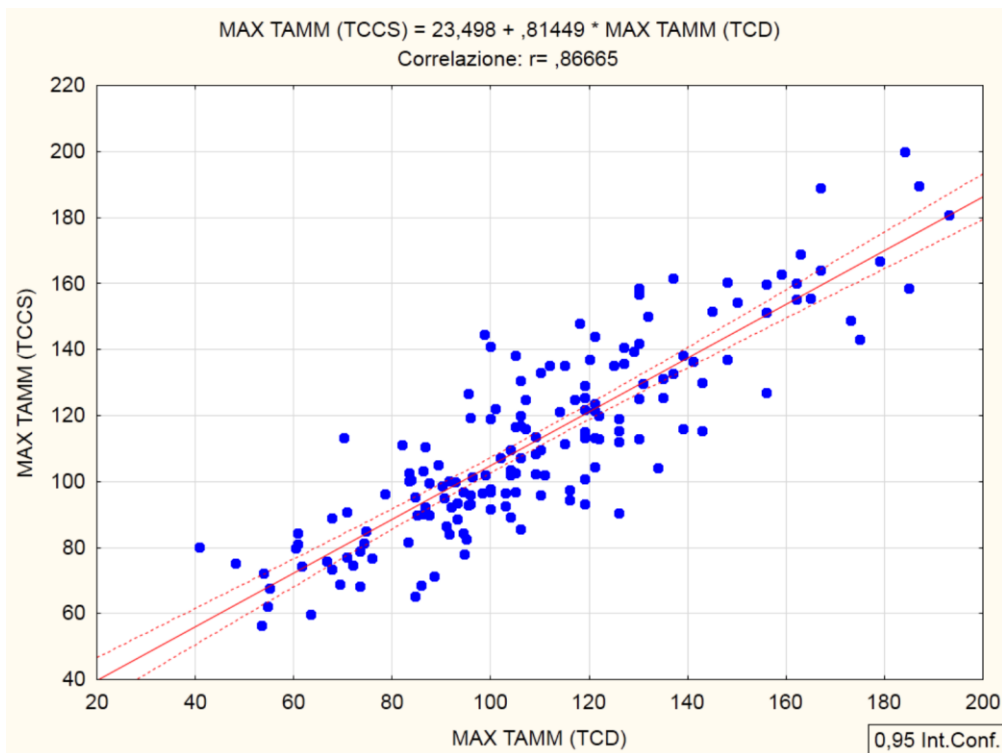
Le Tamm massime vengono riconosciute nello stesso tratto della ACM nel 35,4% dei casi (29 su 82).

La correlazione lineare fra i valori di Tamm massima rilevati al TCD e quelli rilevati al TCCS è stata pari a $r=0.86$, $p<0.000001$. La figura sottostante mostra la correlazione.



ACM destra e sinistra

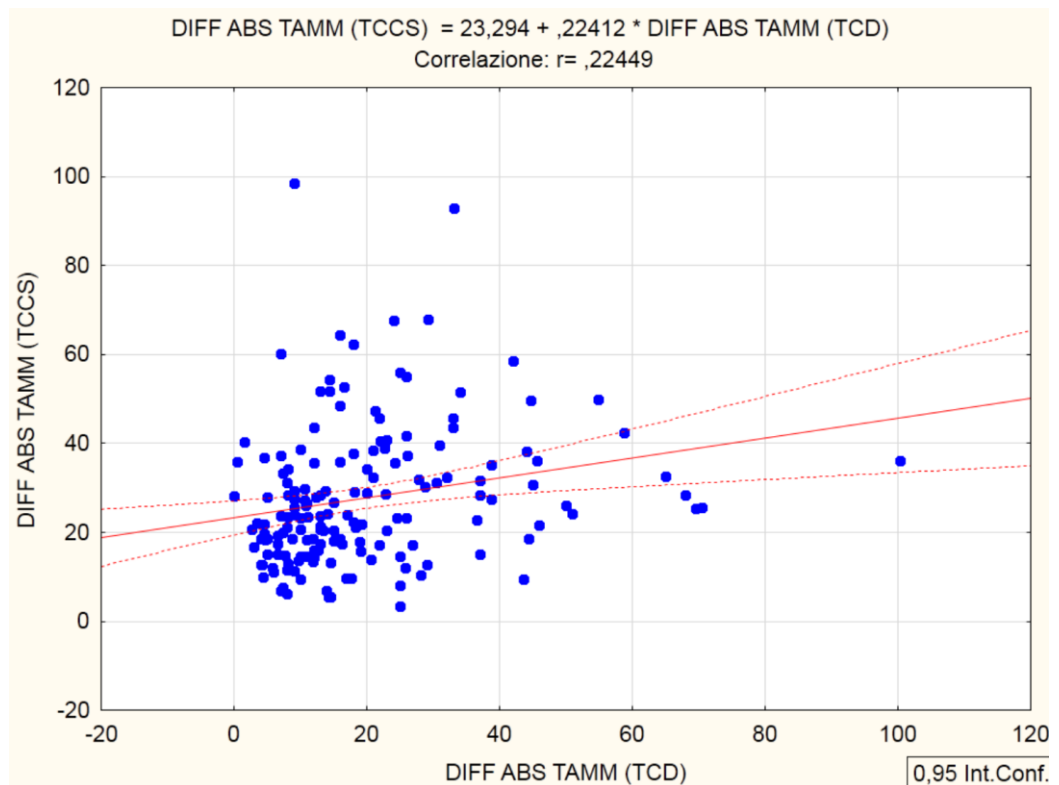
Considerando tutti i valori di TCD e TCCS, indipendentemente dal lato, abbiamo una correlazione lineare con $r=0.87$ $p<0.000001$. La figura sottostante mostra la correlazione.



I valori di Tamm al TCCS sono significativamente più elevati dei valori al TCD (T di Student per dati appaiati, $p=0.008$), essendo la media dei valori di Tamm TCCS pari a 112.5 ± 28.9 e quella del TCD pari a 109.3 ± 30.8

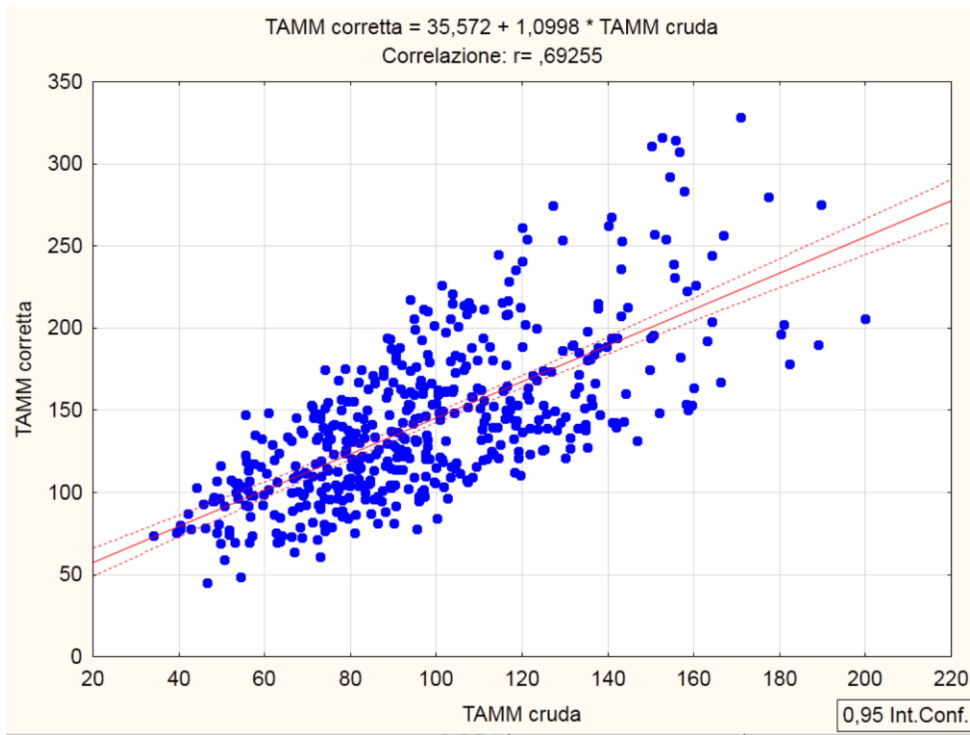
Si sono rilevate cospicue differenze di Tamm nei vari tratti della ACM sia per quanto riguarda il TCCS (27.7 ± 15.7) che il TCD (19.7 ± 15.7); il TCCS ha mostrato variazioni significativamente più elevate rispetto al TCD (T di Student per dati appaiati, $p < 0.000001$).

Tali differenze sono risultate molto scarsamente correlate fra TCD e TCCS ($r=0.22$, $p < 0.000001$)



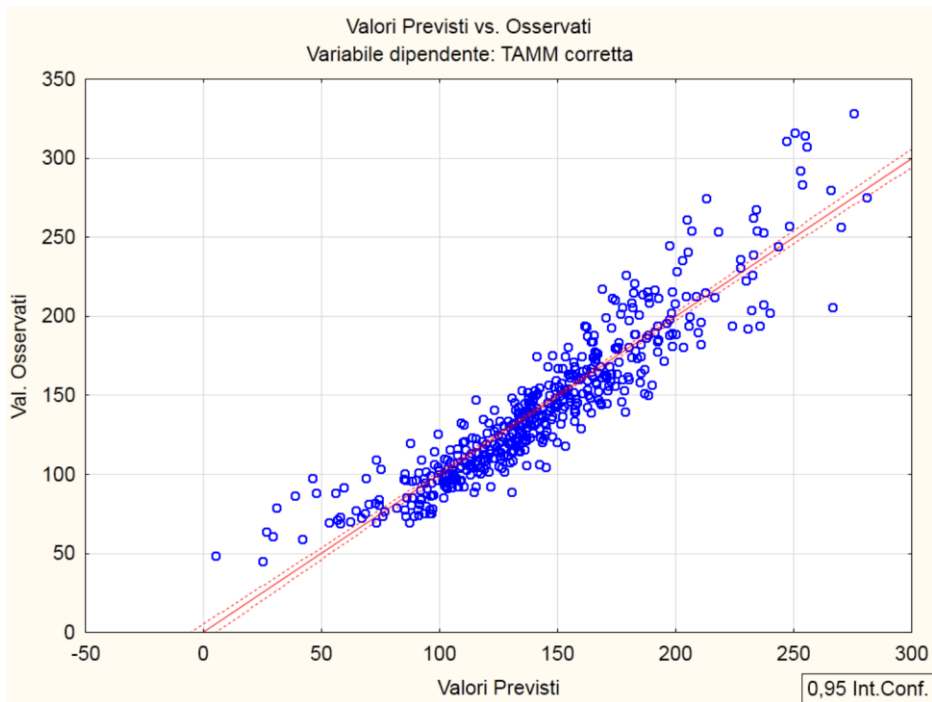
Il TCCS con correzione angolare.

In 64 casi su 82 (78%) è stato eseguito il TCCS con correzione angolare. I valori di Tamm corretta correlano linearmente con i valori di Tamm non corretta ($r=0.69$, $p<0.000001$). I valori medi di Tamm corretta (142.5 ± 47.9) sono significativamente più elevati (T di Student per dati appaiati, $p<0.00001$) dei valori di Tamm cruda (97.2 ± 30.2). La figura seguente mostra la correlazione fra Tamm corretta e Tamm cruda: i valori si riferiscono alle Tamm calcolate sui tratti M1-M4.



Considerando nella funzione di regressione lineare la Tamm corretta come variabile dipendente e la Tamm cruda e l'angolo di correzione come variabili indipendenti, si ottiene $r=0.93$ per il modello totale. La correlazione parziale per Tamm cruda è pari a 0.91 e per correzione angolare è pari a 0.85.

Lo scatterplot fra valori attesi e valori osservati, introducendo la correzione angolare è il seguente:



TCD e TCCS (Follow-up)

Popolazione

Degli 82 bambini, 46 sono stati rivalutati. Il tempo medio trascorso fra la prima e la seconda valutazione è stato di 11.3 ± 5 mesi (range: 1 – 23). Tale gruppo (M=24 F=22) presentava un'età media pari a 7.3 ± 3.5 anni (range: 2 – 15 anni). L'età media delle femmine era di 6.2 ± 2.9 anni, quella dei maschi di 8.3 ± 3.7 : tale differenza è risultata statisticamente significativa ($p=0.047$).

La TAMM

La seguente tabella mostra come si sono distribuiti i casi di TAMM massima (TCCS non corretto) nei vari tratti della ACM indipendentemente dal lato, alla prima ed alla seconda valutazione.

	MAX TAMM TCCS PRIMA	MAX TAMM TCCS SECONDA				Totali	% Colonna
		M1	M2	M3	M4		
Freq.	M1	4	1	2	3	10	10,87
Perc. Riga		40,00%	10,00%	20,00%	30,00%		
Freq.	M2	2	5	8	7	22	23,91
Perc. Riga		9,09%	22,73%	36,36%	31,82%		
Freq.	M3	2	6	8	14	30	32,61
Perc. Riga		6,67%	20,00%	26,67%	46,67%		
Freq.	M4	1	1	7	21	30	32,61
Perc. Riga		3,33%	3,33%	23,33%	70,00%		
Freq.	TUTTI	9	13	25	45	92	
Perc. Riga		9,78	14,13	27,17	48,91		
Concordanza=		41,30					

La concordanza media è stata del 41.3; il tratto in cui più volte si è riconfermata la presenza della massima TAMM è stato M4. M4 è anche il tratto in cui si è avuta la maggior presenza di TAMM massime alla seconda valutazione: passa da 30 (32.6%) a 45 (48.9%).

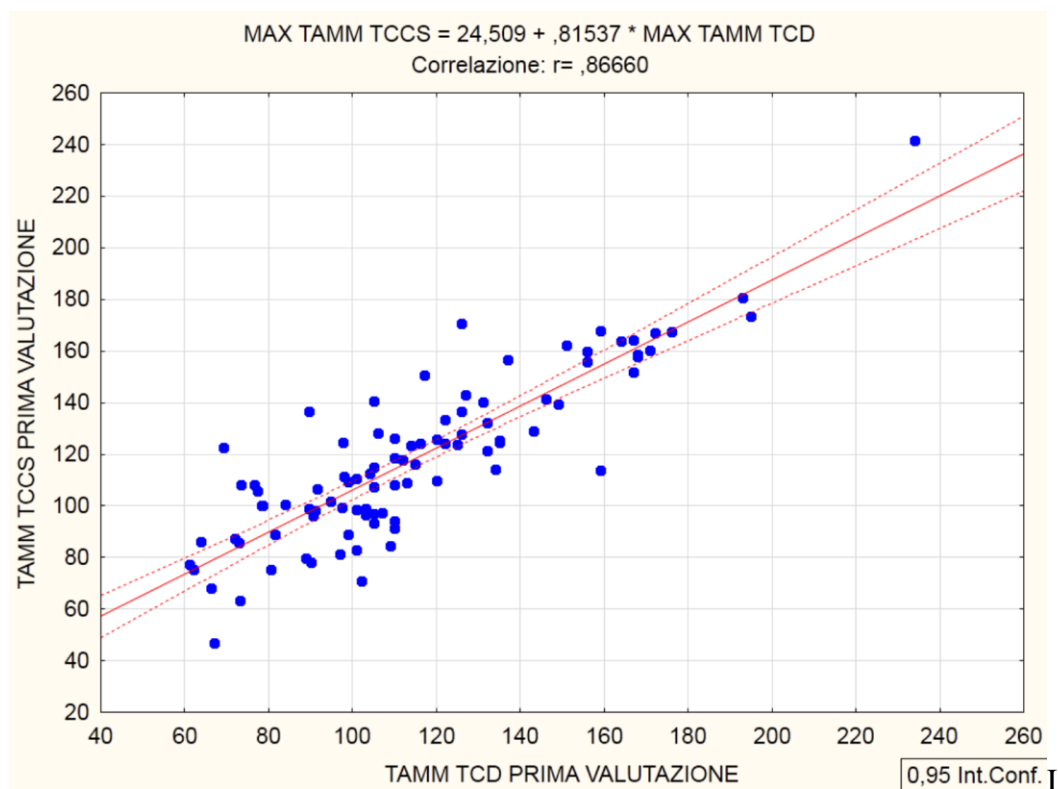
La massima TAMM non ha dimostrato differenze significative ($p=0.77$) fra la prima (118.4 ± 32) e la seconda valutazione (117 ± 32).

Per quanto riguarda il TCD, la distribuzione delle Tamm massime nei vari tratti della ACM alla prima e seconda valutazione è stata la seguente:

	MAX Tamm TCD PRIMA	MAX Tamm TCD SECONDA				Totali	% Colonna
		M1	M2	M3	M4		
Freq.	M1	3	5	7	4	19	20,65
Perc. Riga		15,79%	26,32%	36,84%	21,05%		
Freq.	M2	4	8	8	5	25	27,17
Perc. Riga		16,00%	32,00%	32,00%	20,00%		
Freq.	M3	4	6	11	6	27	29,35
Perc. Riga		14,81%	22,22%	40,74%	22,22%		
Freq.	M4	1	3	7	10	21	22,83
Perc. Riga		4,76%	14,29%	33,33%	47,62%		
Freq.	TUTTI	12	22	33	25	92	
Perc. Riga		13,04	23,91	35,87	27,17		
Concordanza=		34,78					

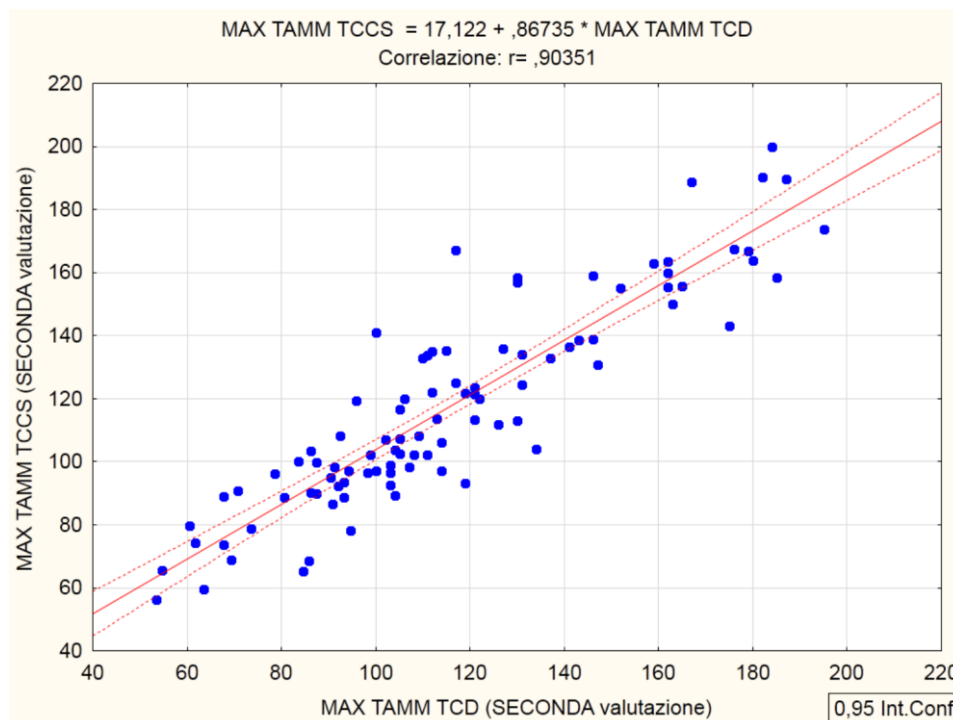
La concordanza media è stata del 35%; il tratto in cui più volte si è riconfermata la presenza della massima Tamm è stato M4. La massima Tamm non ha dimostrato differenze significative ($p=0.83$) fra la prima (115.2 ± 34) e la seconda valutazione (115.7 ± 33).

I valori di TCD e TCCS sono risultati linearmente correlati ($r=0.87$, $p<0.000001$), come riportato nel grafico seguente:



valori della Tamm calcolata al TCCS (118.4 ± 31.9) sono più elevati di quelli calcolati con il TCD (115.2 ± 34) ma non in maniera statisticamente significativa (T di Student per dati appaiati, $p=0.07$).

Per quanto riguarda la seconda valutazione, la correlazione lineare porge $r=0.9$ ($p<0.000001$) ed è qui sotto rappresentata:



I valori della Tamm calcolata al TCCS (117.7 ± 32.6) sono più elevati di quelli calcolati con il TCD (115.9 ± 34) ma non in maniera statisticamente significativa (T di Student per dati appaiati, $p=0.25$).

Considerando i valori di cut off proposti per la Tamm TCD e TCCS, si ottiene la seguente tabella:

	TCCS PRIMA VALUTAZIONE	TCD PRIMA VALUTAZIONE			Totali
		NORMAL	CONDITIONAL	ABNORMA L	
Freq.	NORMAL	76	0	0	76
Perc. Riga		100,00%	0,00%	0,00%	
Freq.	CONDITIONAL	10	4	0	14
Perc. Riga		71,43%	28,57%	0,00%	
Freq.	ABNORMA L	0	1	1	2
Perc. Riga		0,00%	50,00%	50,00%	
Freq.	Tutti	86	5	1	92
	Concordanza=	88,04			

Vi è una concordanza del 88%: da notare che il TCCS “vede” 14 “conditional” e 2 “abnormal”, mentre il TCD ne vede rispettivamente 5 e 1.

Analogamente per la seconda valutazione, si ha la seguente distribuzione:

	TCCS	TCD SECONDA VALUTAZIONE			Totali
	SECONDA VALUTAZIONE	NORMAL	CONDITIONAL	ABNORMAL	
Freq.	NORMAL	73	1	0	74
Perc. Riga		98,65%	1,35%	0,00%	
Freq.	CONDITIONAL	10	4	0	14
Perc. Riga		71,43%	28,57%	0,00%	
Freq.	ABNORMAL	1	3	0	4
Perc. Riga		25,00%	75,00%	50,00%	
Freq.	Tutti	84	8	0	92
	Concordanza=	83,70			

Vi è una concordanza del 84%: da notare che il TCCS “vede” 14 “conditional” e 4 “abnormal”, mentre il TCD vede solo 8 “conditional”.

3.4 DISCUSSIONE

Confronto TCD e TCCS

Studio cross sectional

La velocità nell'arteria cerebrale media destra e sinistra nei suoi tratti M1, M2, M3 e M4 è stata studiata con tre metodiche (TCD, TCCS con e senza correzione angolare) in 82 bambini. I valori di TAMM rilevati al TCD sono risultati molto correlati ($r=0.87$) ai valori rilevati al TCCS senza correzione, in accordo con i dati della letteratura (Bulas D.I. 2000, Jones A.M 2001, Nish A.S. 2002, McCarville M.B., 2004, Padayachee S.T. 2011). I valori rilevati al TCCS sono stati significativamente più elevati, ma tale differenza seppur statisticamente significativa, non appare essere clinicamente rilevante essendo la media dei valori di TAMM TCCS pari a 112.5 ± 28.9 e quella del TCD pari a 109.3 ± 30.8 : una differenza inferiore al 3%. Nel campione più ristretto in cui è stato eseguito anche il follow-up (46 bambini), pur rimanendo il dato di una maggiore velocità media rilevata al TCCS, la significatività non viene più raggiunta. Questo dato va però considerato importante, in quanto in precedenti lavori il TCCS aveva mostrato valori medi inferiori al TCD (Bulas D.I. 2000, Jones A.M 2001, Nish A.S. 2002, McCarvill M.B., 2004), e quindi erano stati proposti valori soglia per la definizione di "normal", "conditional" e "abnormal" più bassi di quelli definiti per il TCD. Il più recente lavoro di Padayachee S.T. (2011) è invece in linea con i nostri risultati. Le implicazioni che si avrebbero avute nel nostro campione, correggendo il TCCS secondo i valori soglia proposti, vengono discusse nel paragrafo dedicato al follow-up. In ogni caso, nell'affrontare il problema, vanno considerate molte componenti: la numerosità campionaria dei vari studi, il tipo di apparecchiatura usata, la standardizzazione delle metodiche, la preparazione il più possibile omogenea degli operatori.

L'aver analizzato i quattro tratti della ACM, ci ha permesso di valutare in quali tratti vengono più frequentemente rilevate le velocità massime sia per TCD che per TCCS. Sia a destra che a sinistra TCD e TCCS sono concordi nell'evidenziare il fatto che la velocità massima viene rilevata meno frequentemente nel tratto M1 (si va da un minimo del 2.5% rilevato dal TCD a sinistra, ad un massimo del 16% rilevato dal TCD a destra). Si è potuto anche calcolare quante volte la massima TAMM è stata riscontrata nello stesso tratto sia al TCD che al TCCS: questo è

accaduto nel 31% dei casi (26.8% a destra, 35.37% a sinistra). E' interessante prendere in considerazione la variazione di velocità riscontrata nella ACM. A questo scopo è stata calcolata la differenza fra la massima e la minima velocità rilevata esplorando i quattro tratti. Tale differenziale di velocità è risultato significativamente superiore nel TCCS (27.7 ± 15.7) che nel TCD (19.7 ± 15.7): questo dato è verosimilmente legato alla possibilità data dal TCCS di seguire visivamente il vaso e di campionare con più precisione rispetto ai vari tratti. Questo spiegherebbe anche perché la distribuzione del numero delle TAMM massime rilevate al TCCS rispetto ai quattro tratti della ACM siano molto simili a destra ed a sinistra, mentre tale riscontro non si ha con il TCD. Infatti la TAMM massima rilevata al TCCS nei vari tratti è stata: tratto M1 12.2% a destra e 9.8 a sinistra; tratto M2 18.3% a destra e 24.4% a sinistra; tratto M3 35.4% a destra e 36.6% a sinistra; tratto M4 34.2% a destra e 29.3% a sinistra. Molta variabilità si è riscontrata nel caso del TCD: tratto M1 15.9% a destra e 2.4% a sinistra; tratto M2 29.3% a destra e 18.3% a sinistra; tratto M3 32.9% a destra e 39% a sinistra; tratto M4 21.9% a destra e 40.2% a sinistra.

I valori della TAMM rilevati al TCCS con correzione angolare correlano con i valori rilevati senza correzione angolare ($r=0.69$), e presentano valori medi significativamente più elevati. Il problema di definire un cut-off oltre il quale non procedere alla correzione angolare rimane un problema aperto. La letteratura ritiene che valori superiori a 60° di correzione angolare inducano stime molto elevate e distorte di velocità. Baumgartner RW (1999) suggerisce di non apportare alcuna correzione angolare in arterie che non siano almeno di 20 mm di lunghezza. Tale rilievo appare particolarmente importante quando l'esame venga effettuato in bambini piccoli.

Studio di follow-up

Degli 82 bambini oggetto dello studio cross sectional, 42 sono stati rivalutati a distanza di circa un anno. La TAMM massima è stata riscontrata nello stesso tratto della ACM nel 41.3% dei casi valutati con TCCS e nel 35% nel caso del TCD. La TAMM massima non ha mostrato differenze significative fra la prima e la seconda valutazione né al TCD né al TCCS, mostrando quindi una stazionarietà del campione dal punto di vista velocitometrico.

Se nel nostro campione avessimo utilizzato i cut off suggeriti per il TCCS, esso avrebbe rilevato alla prima valutazione 14 “conditional” e 2 “abnormal”, contro rispettivamente 5 e 1 al TCD ed alla seconda valutazione 14 “conditional” e 2 “abnormal” contro 8 “conditional” e nessun abnormal del TCD. Appare quindi importante stabilire dei cut-off che si basino su popolazioni più ampie, in quanto l’eventuale correzione induce significativi cambiamenti nella valutazione clinica. Per quanto riguarda il confronto fra la prima e la seconda valutazione TCD c’è da notare che dei 5 “conditional” alla prima valutazione 2 permangono tali alla seconda e tre si normalizzano, mentre l’unico “abnormal” diventa “conditional”. Degli 86 normali alla prima valutazione, 5 diventano “conditional” alla seconda.

4 VALUTAZIONE RMN e Angio-RMN

In un sottogruppo di 44 bambini in cui sono stati raccolti i dati relativi alla RMN per identificare e misurare la presenza degli Infarti Silenti, la Angio-RMN e i dati ultrasonografici (Doppler TCD, TCCS con e senza correzione). Sono state valutate l'Arteria Cerebrale Anteriore, la Cerebrale Media e la Cerebrale Posteriore.

4.1 MATERIALI E METODI

I 44 bambini (F=23, M=21) avevano una età media pari a 8.4 ± 3.8 anni (mediana: 8, range: 2-18 anni). Non vi era differenza significativa nell'età media fra maschi e femmine ($p=0.33$). La diagnosi era HbS/HbS in 40 casi, HbS/HbC in 3 casi e HbS/ β thal in un caso.

Per la RMN è stato utilizzato uno scanner di Risonanza Magnetica da 1,5 T (Achieva, Philips Medycal System) senza somministrazione di mdc. Secondo indicazioni Zimmerman (2005) sono state acquisite sequenze atte alla valutazione del parenchima encefalico e del circolo arterioso intracranico. In dettaglio:

- **Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR)** per la valutazione di lesioni ischemiche/croniche soprattutto a carico della sostanza bianca.
- **Diffusion weighted Imaging (DWI)** per la valutazione di lesioni ischemiche recenti
- **Angio-RMN del Willis** per la valutazione di stenosi ed occlusioni a carico del Willis.

Il protocollo della durata di circa 12-13 minuti, è stato utilizzato per la valutazione del carico lesionale e delle alterazioni vascolari. Le lesioni ischemiche sono state distinte in:

Infarti territoriali (corticale/sottocorticale)

Infarti lacunari (centri semiovali o gangli della base)

Atrofia senza chiara distribuzione

Infarti nelle regioni di confine

Per la valutazione dell'Angio-RM è stata utilizzata la scala di Houkin (Houkin K. 2005):

- 0) stenosi assente**
- 1) stenosi di grado moderato**
- 2) stenosi serrata**
- 3) occlusione completa del tratto esaminato**

4.2 ANALISI STATISTICA

Per le variabili a distribuzione normale è stata usata il T di Student quando i gruppi erano 2 o l'Analisi della Varianza ad una via quando i gruppi erano superiori a due. Per valutare gli effetti di interazione è stata usata l'Analisi della Varianza a 2 vie. Poiché la numerosità dei singoli gruppi era molto diversa, l'analisi Post-Hoc è stata condotta utilizzando il test di Scheffé.

Le variabili di tipo qualitativo sono state analizzate utilizzando il Chi quadro di Pearson o il Fisher Exact test. Le correlazioni lineari fra i valori di TMMM calcolate con TCD, e TCCS con e senza correzione rispetto ai risultati AngioRMN sono state valutate con il Rho e Spearman. Il livello di significatività prefissato è stato $p < 0.05$.

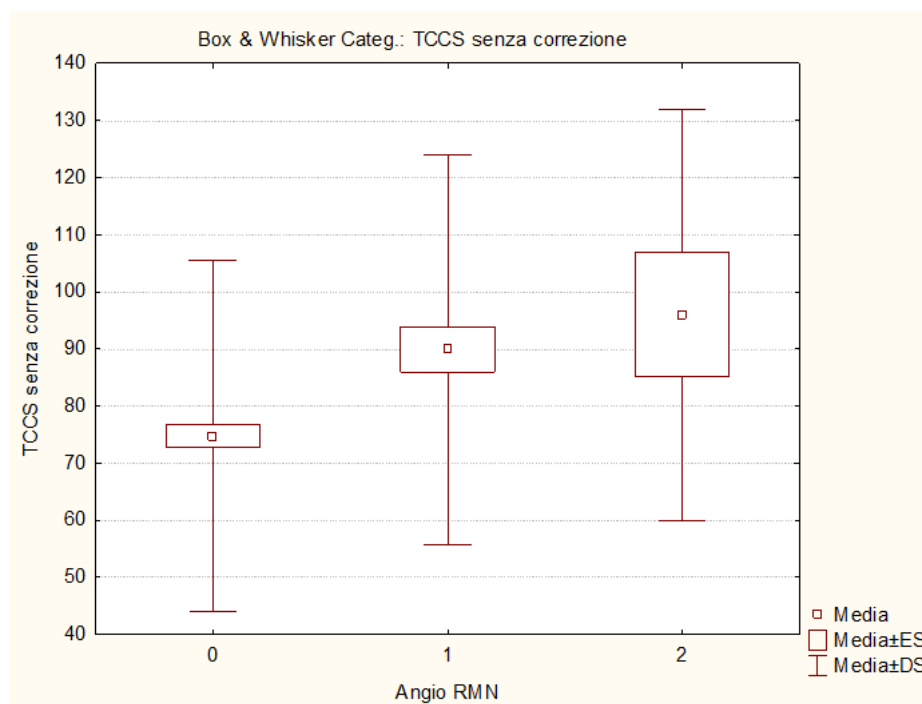
4.3 RISULTATI

4.3.1 Confronto dati Angio-RMN verso TCCS e TCD: correlazioni.

Si sono confrontati i risultati Angio-RMN versus TCCS e TCD, per ogni segmento insonato. In pratica quindi, si sono messe in relazione le risposte Angio-RMN verso il TCCS e il TCD non rispetto ai pazienti, ma rispetto ad ogni segmento. I valori medi della TMMM TCCS senza correzione rispetto all'Angio RM sono riportati nella seguente tabella.

Angio-RM	TCCS senza correzione (Media±SD)	N casi
0	74,73±30,79	258
1	89,93±34,10	73
2	96,00±36,01	11
Tutti	78,66±32,35	342

La tendenza lineare è rappresentata dalla seguente figura (Rho=0.2, p<0.0002)

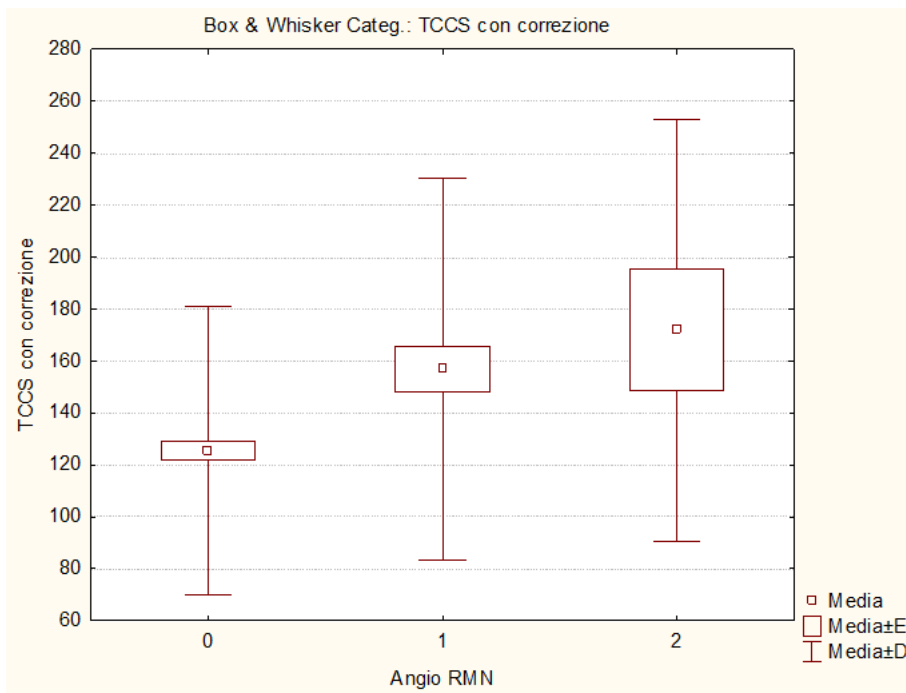


Il tests di Scheffé mostra una differenza significativa per il gruppo Angio- RMN= 0 → Angio-RMN= 1 (p=0.002)

I valori medi della TMM TCCS con correzione rispetto all'Angio-RMN sono riportati nella seguente tabella.

Angio-RMN	TCCS con correzione	
	Media±SD	N casi
0	125,28±55,51	239
1	156,89±73,69	69
2	171,92±81,27	12
Tutti	133,84±62,52	320

La tendenza lineare è rappresentata dalla seguente figura (Rho=0.21, p<0.0002)



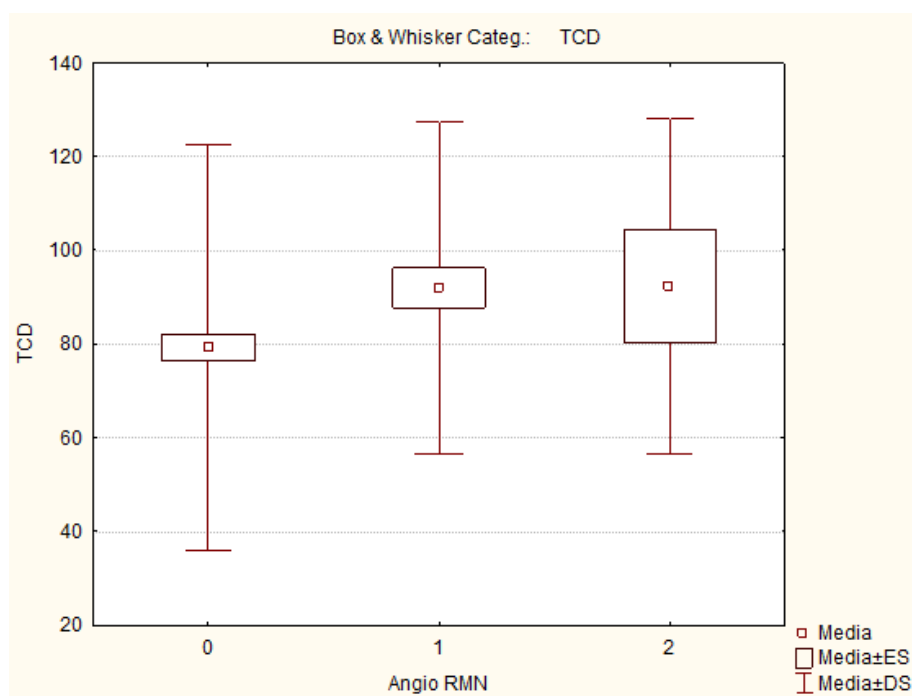
Il tests di Scheffé mostra una differenza significativa sia per il gruppo Angio-RMN= 0 → Angio-RMN= 1 ($p=0.001$) che per il gruppo Angio-RMN= 0 → Angio-RMN= 2 ($p=0.036$).

I valori medi della TAMD TCD rispetto all'Angio RMN sono riportati nella seguente tabella.

Angio- RMN	TCD Media±SD	N casi
0	79,20±43,46	246
1	91,95±35,43	71
2	92,22±35,88	9
Tutti	82,34±41,91	326

Esiste una tendenza alla significatività ($p=0.06$)

La figura sottostante mostra la tendenza lineare ($Rho=0.18$, $p<0.001$)



Nella seguente tabella vengono riportati i risultati Angio-RMN rispetto alla classificazione TCD, indipendentemente dal lato e dal tratto.

	<u>Angio RMN</u>	<u>TCD</u>			<u>Totali - Riga</u>
		<u>Normal</u>	<u>Conditional</u>	<u>Abnormal</u>	
Conteggi	0	259	6	3	268
% riga		96,64%	2,24%	1,12%	
Conteggi	1	66	4	0	70
% riga		94,29%	5,71%	0,00%	
Conteggi	2	9	0	0	9
% riga		100,00%	0,00%	0,00%	
Conteggi	Tutti	334	10	3	347

La distribuzione non è significativa: in particolare c'è da osservare che i 3 casi visti come "ABNORMAL" al TCD vengono visti normali alla Angio-RMN, che dei 10 casi "CONDITIONAL", 6 erano normali alla Angio-RMN e che dei 79 casi non normali alla Angio-RMN, 4 erano visti "CONDITIONAL" al TCD.

4.3.2 AngioRMN rispetto a sesso ed età

Non esiste differenza significativa nella distribuzione delle risposte alla Angio-RMN né rispetto al sesso ($p=0.33$), né rispetto all'età ($p=0.27$)

4.3.3. Angio RMN e Doppler rispetto alla presenza di Infarti Silenti.

In 19 pazienti su 44 sono stati riscontrati Infarti Silenti. L'Angio-RMN è risultata alterata in almeno una arteria in 27 casi a destra e in 29 casi a sinistra. In 36 casi è risultata alterata, indipendentemente dal lato mentre era è risultata alterata in 20 casi sia a destra che a sinistra.

Considerando solo la stenosi serrata, l'Angio-RMN è risultata alterata in almeno una arteria in 6 casi a destra e in 5 casi a sinistra. In 8 casi è risultata alterata, indipendentemente dal lato mentre era è risultata alterata in 3 casi sia a destra che a sinistra.

Non si è trovata nessuna associazione significativa fra il reperto Angio-RMN e la presenza di Infarti Silenti. Infatti dei 36 casi di stenosi, 16 erano relativi ai 19 casi con Infarti Silenti e 20 ai restanti 25 casi ($p=1$); degli 8 casi di stenosi serrata, 3 erano relativi ai 19 casi con Infarti Silenti e 5 ai restanti 25 casi ($p=1$).

Analogamente non è stata trovata alcuna correlazione fra i valori di TCD e la presenza di Infarti Silenti.

4.4 DISCUSSIONE

RMN, Angio-RMN, Doppler e presenza di Infarti Silenti

In un sottogruppo di 44 bambini sono stati raccolti i dati relativi alla RMN per identificare e misurare la presenza degli infarti silenti, la Angio-RMN e i dati ultrasonografici (Doppler TCD, TCCS con e senza correzione). Sono state valutate l'arteria cerebrale anteriore, la cerebrale media e la cerebrale posteriore. Si sono confrontati i risultati Angio-RMN versus TCCS e TCD, per ogni segmento insonato. In pratica quindi, si sono messe in relazione le risposte Angio-RMN verso il TCCS e il TCD non rispetto ai pazienti, ma rispetto ad ogni segmento. Per standardizzare la risposta Angio-RMN, è stata utilizzata la scala di Houkin (Houkin K. 2005):

- 0 stenosi assente**
- 1 stenosi di grado moderato**
- 2 stenosi serrata**
- 3 occlusione completa del tratto esaminato**

In nessun caso è stata trovata una occlusione completa. Il TCCS sia con che senza correzione ha evidenziato differenze significative nelle medie velocità, nel senso che la velocità media dimostra un andamento crescente linearmente da stenosi assente → stenosi moderata → stenosi serrata. Anche il TCD mostra lo stesso andamento, ma la significatività non viene raggiunta, anche se per pochissimo ($p=0.06$).

Il TCD aveva identificato 10 casi "conditional" e 3 "abnormal": dei 10 conditional, 6 presentavano assenza di stenosi, e 4 presentavano una stenosi di grado moderato. I tre casi "abnormal" presentavano assenza di stenosi.

E' quindi evidente che mentre nel campione esiste una differenza nelle velocità medie rispetto al grado di stenosi, nel singolo caso nulla può essere detto.

Tale rilievo è consistente con la constatazione che nell'Angio-RMN si rilevano dati morfologici, mentre l'ultrasonografia Doppler esprime le alterazioni dell'emodinamica cerebrale.

La RMN ha riscontrato la presenza di Infarti Silenti in 19 pazienti. Una stenosi almeno moderata è stata riscontrata in 36 casi, 16 dei quali erano associati alla presenza di infarti. Considerando invece la presenza di stenosi serrata, essa è stata

riscontrata in 8 casi, tre dei quali erano associati alla presenza di infarti. La distribuzione dei casi è risultata completamente indipendente dalla presenza o meno di Infarti Silenti ($p=1$).

La presenza di infarti non è risultata significativamente associata neppure ai valori della TMM

La mancanza totale di relazione fra presenza di Infarti Silenti e dati Angio-RMN e Doppler, è spiegabile con il fatto che la RMN “fotografa” una situazione cronica, mentre sia il dato Angio-RMN che il dato Doppler, con le loro rispettive specificità, documentano uno stato attuale rispettivamente anatomico e emodinamico.

5 VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA

5.1 MATERIALI E METODI

Un sottogruppo di 39 bambini (19M e 10F), di età compresa tra 6 e 16 anni sono stati valutati sotto il profilo neuropsicologico.

Al sottogruppo di 15 pazienti con età inferiore ai 6 anni è stata somministrata la *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence* (WPPSI-R), scala di intelligenza per i bambini in età prescolare (da 4 a 6 anni e 6 mesi). Dei 15 piccoli pazienti, 4 avevano presenza di lesioni silenziose cerebrali (IS) alla RMN: un numero insufficiente per eseguire alcuna statistica.

Ai restanti 24 casi di età tra 6 e 16 anni di cui 12 presentavano I.S. alla RMN, è stata somministrata la batteria di tests della *Wechsler Intelligence Scale for Children* (WISC-III) per bambini in età scolare (Wechsler, 1992).

L'età media dei bambini con e senza Infarti Silenziosi era identica: 10,9 vs 10,5 anni.

La WISC-III è composta da 13 subtest divisi in due gruppi:

SUBTEST VERBALI	SUBTEST DI PERFORMANCE
2) Informazione	1) Completamento Figure
4) Somiglianze	3) Cifrario
6) Ragionamento aritmetico	5) Riordinamento di storie figurate
8) Vocabolario	7) Disegno con i cubi
19) Comprensione	9) Ricostruzione di oggetti
12) Memoria di cifre ^a	11) Ricerca di simboli ^b
	13) Labirinti ^a

^a Subtest Supplementare

^b Subtest Opzionale

Il numero che precede i vari sub test indica la loro posizione nell'ordine di somministrazione (alternando una prova della Scala Verbale ad una prova della Scala di Performance). La particolarità del test di Performance, consiste nel fatto che minimizza il ruolo del linguaggio poiché si chiede all'esaminando di rispondere in modo non verbale e spesso usando per i loro compiti, materiali concreti come costruzioni con i cubi, tavole con forme ecc. Ben si adatta quindi a bambini stranieri che spesso in famiglia parlano un'altra lingua.

L'esecuzione di ciascuno dei Subtest dà luogo ad un punteggio grezzo, trasformato poi in ponderato per età attraverso il riferimento ad una distribuzione normale con $M=10$ e $DS=3$

I punteggi scalari vengono poi convertiti, attraverso apposite tabelle, nei rispettivi QI di deviazione con $M=100$ e $DS=15$.

La prestazione del bambino è valutata mediante 3 punteggi compositi:

1. **Punteggio Verbale:** somma dei punteggi ponderati della Scala Verbale che corrisponde ad un Quoziente Intellettivo Verbale (QIV)
2. **Punteggio di Performance:** somma dei 5 punteggi ponderati della Scala di Performance che corrisponde ad un Quoziente Intellettivo di Performance (QIP)
3. **Punteggio Totale:** somma del Punteggio Verbale e del Punteggio di Performance che corrisponde al Quoziente Intellettivo Totale (QIT).

Oltre ai QIV, QIP e QIT si sono valutati 4 punteggi fattoriali :

Fattore I: Comprensione Verbale	Fattore II: Organizzazione Percettiva	Fattore III: Libertà dalla Distraibilità	Fattore IV: Velocità di Elaborazione
Informazione	Completamento Di figure	Ragionamento aritmetico	Cifrario
Somiglianze	Storie figurate	Memoria di cifre	Ricerca di simboli
Vocabolario	Disegno con cubi		
Comprensione	Ricostruzione di oggetti		

Nello specifico:

Comprensione verbale: esprime la capacità di operare mentalmente su contenuti di natura verbale mediante le conoscenze acquisite attraverso l'educazione e l'ambiente.

Organizzazione percettiva: esprime la capacità di operare mentalmente su contenuti di natura visiva e di organizzarli secondo schemi visuo-spazio-motori

Libertà dalla distraibilità: esprime la capacità di indirizzare l'attenzione su compiti specifici e di mantenerla concentrata inibendo le attività concorrenti.

Velocità di elaborazione: il sub test Ricerca di simboli, che insieme a Cifrario rappresenta il quarto fattore, è stato aggiunto al fine di far emergere meglio le abilità misurate dal terzo fattore.

5.2 ANALISI STATISTICA

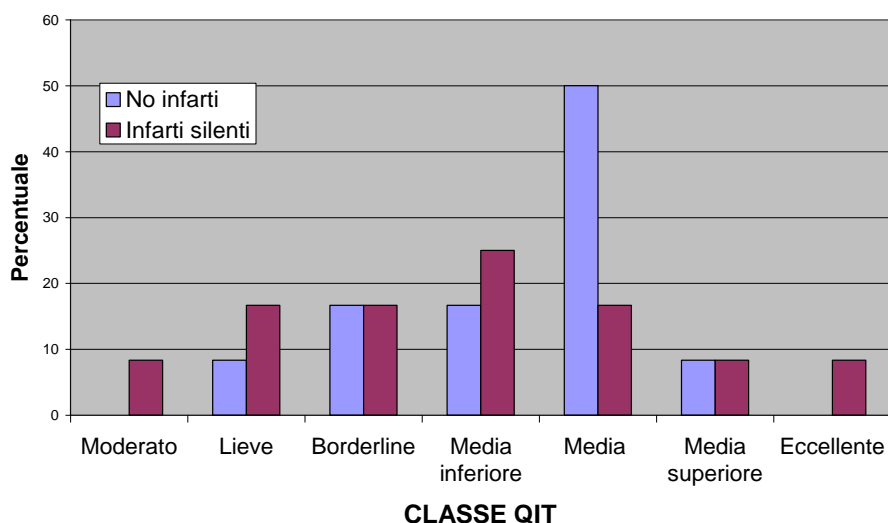
Per le variabili a distribuzione normale sono stati utilizzati il T di Student, l'Analisi della Varianza e della Covarianza. Per le variabili qualitative ordinali è stato utilizzato il Mann Whitney U test. La eventuale correlazione lineare fra i valori ai punteggi QI (V, P e T) e fattoriali, rispetto al numero e volume delle lesioni riscontrate alla RMN è stato utilizzato il Rho di Spearman. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$

5.3 RISULTATI

Al sottogruppo con età inferiore a 6 anni (prescolare) non è stato possibile eseguire alcuna statistica, per la bassa numerosità campionaria.

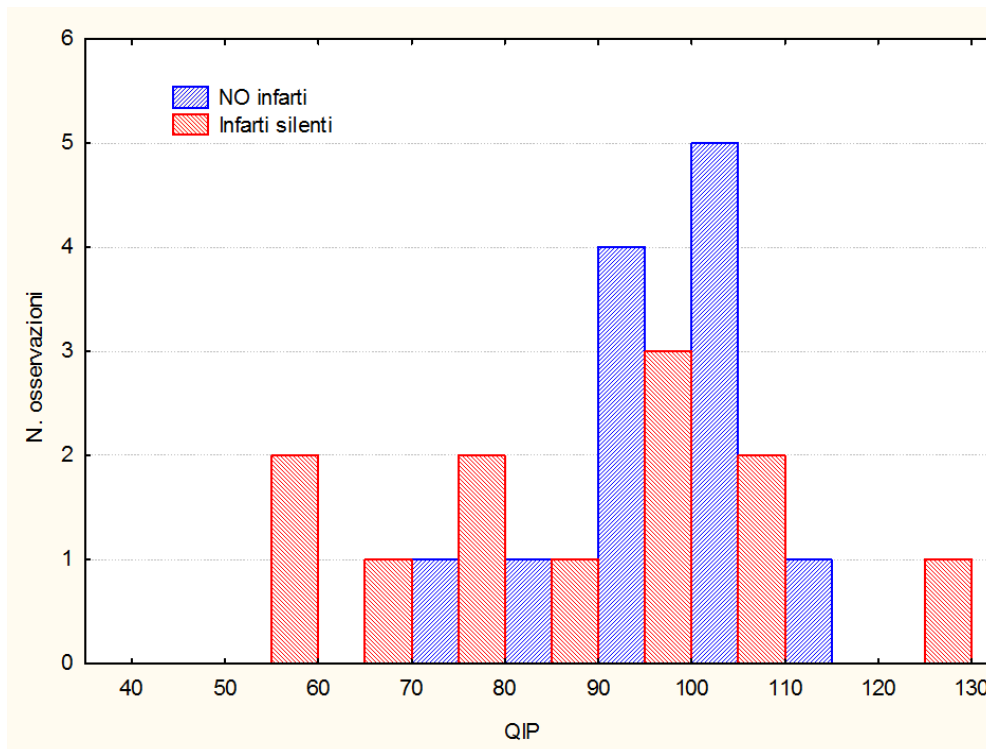
La WISC-III è stata somministrata al sottogruppo di 24 bambini 12 dei quali presentavano infarti silenti. In 4 casi, la scuola ha richiesto avvio alla certificazione per: 1 caso di dislessia, e 3 affetti da ADHD. Ad una prima valutazione qualitativa, l'esaminatore ha rilevato una certa emotività e ansia di prestazione in 10 casi con necessità di incoraggiamento.

Per quanto riguarda il QIT, il Mann-Whitney U test (Test a una coda), non evidenzia alcuna differenza statisticamente significativa ($p=0.8$) nei due gruppi.(grafico sottostante).

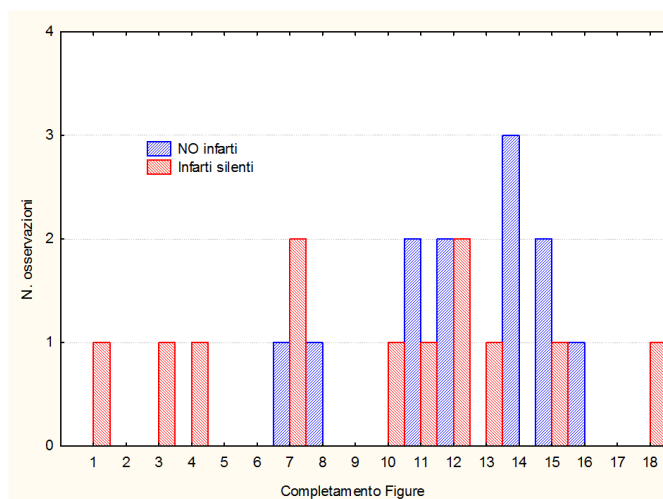


Nella valutazione di QIP si nota i bambini con I.S. hanno valori tendenzialmente più bassi, anche se ci sono bambini con presenza di I.S. che hanno prestazioni medio/superiori ed eccellenti.

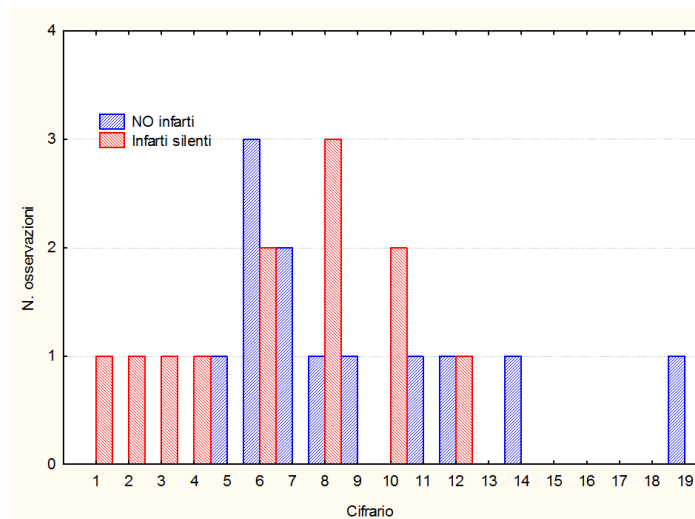
La distribuzione è piuttosto dispersa (vedi grafico sottostante), ma esiste una differenza statisticamente significativa (Mann Whitney U test, $p=0,03$) nel punteggio medio di QIP, presentando i bambini con I.S. un punteggio medio pari a $86,7\pm 21,5$ contro $100,5\pm 11,2$. Essendo l'età media dei due gruppi assolutamente sovrapponibile non si può imputare ad una diversa età l'effetto riscontrato nel gruppo con infarti → non infarti.



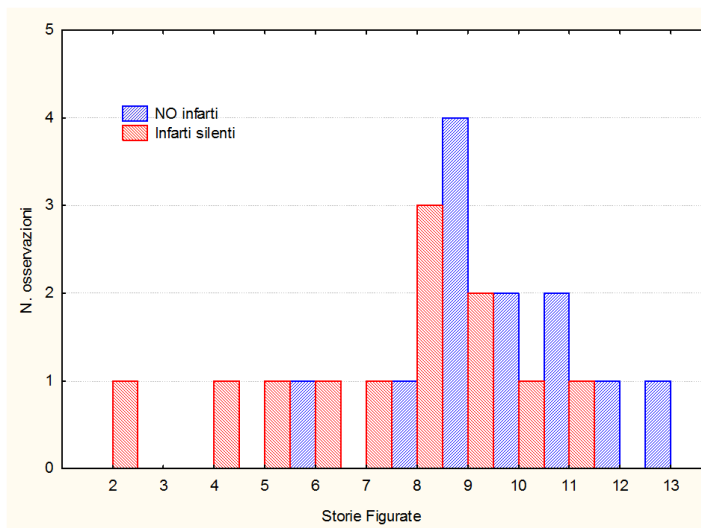
Si sono quindi valutati i sub tests di Performance. “**Completamento Figure**” che riguarda la capacità di analisi e sintesi visiva, come la capacità di identificare elementi mancanti a figure famigliari (ad es. manca un dente al pettine) sfiora la significatività statistica ($p=0,055$), avendo i pazienti con I.S. una media pari a $9,4\pm 5,1$ e quelli senza I.S. una media pari a $12,4\pm 2,1$. I risultati sono rappresentati nella figura sottostante.



Il subtest di Performance **Cifrario** che riguarda la capacità di apprendere materiale insolito: non è risultato statisticamente significativo



Infine al Subtest di Performance **Storie Figurate** la media del punteggio nei bambini con I.S. è stata di $7,2 \pm 2,6$ contro $9,8 \pm 1,9$: la differenza è risultata statisticamente significativa ($p=0,007$). I risultati sono presentati nel grafico sottostante.



Infine si è cercato di correlare la quantificazione del danno anatomico valutata come numero di lesioni, volume e dimensione evidenziate alla RMN con il punteggio di QIP e dei vari subtests. Le tabelle riportano i relativi risultati.

	Spearman - R	t(N-2)	p-value
QIP & Numero infarti	0,139573	0,42286	0,682324
Completamento Figure & Numero	0,224338	0,69062	0,507224
Cifrario & Numero	-0,558987	-2,02244	0,073830
Storie Figurate & Numero	-0,345906	-1,10599	0,297416
Velocità di Elaborazione & Numero	-0,561895	-2,03780	0,072021

Correlazione numero lesioni silenti (RMN) e punteggi QIP

	Spearman - R	t(N-2)	p-value
QIP & lesion burden mm3	-0,081818	-0,24628	0,810990
Completamento Figure & lesion burden mm3	-0,260277	-0,80870	0,439540
Cifrario & lesion burden mm3	-0,391743	-1,27732	0,233456
Storie Figurate & lesion burden mm3	-0,377036	-1,22124	0,253021
Velocità di Elaborazione & lesion burden mm3	-0,373577	-1,20821	0,257755

Correlazione volume lesionale (RMN) e punteggi QIP

	Spearman - R	t(N-2)	p-value
QIP & Dimensioni mm	-0,177677	-0,54165	0,601210
Completamento Figure & Dimensioni mm	-0,249429	-0,77271	0,459506
Cifrario & Dimensioni mm	-0,131649	-0,39841	0,699612
Storie Figurate & Dimensioni mm	-0,322594	-1,02245	0,333266
Velocit di Elaborazione & Dimensioni mm	-0,130137	-0,39376	0,702925

Correlazione dimensione lesione silente (RMN) e punteggi QIP

La correlazione con il numero, dimensione e volume delle lesioni non è risultata significativa ai punteggi dei Subtest di Performance.

5.4 DISCUSSIONE

Valutazione neuropsicologica

La WISC-III è stata somministrata al sottogruppo di 24 bambini 12 dei quali presentavano Infarti Silenti.. Il QIT non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa.

Al contrario esiste una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda il QIP presentando i bambini con I.S. un punteggio medio inferiore.

La valutazione dei subtest ha mostrato una differenza statisticamente significativa per “storie figurate” e sfiora la significatività per “completamento figure” presentando il gruppo con IS valori medi inferiori.

Infine si è cercato di correlare la quantificazione del danno anatomico valutata come numero di lesioni, volume e dimensione evidenziate alla RMN con il punteggio di QIP e dei vari subtests. Nessuna correlazione è stata evidenziata rispetto al volume e alle dimensione, mentre per quanto riguarda il numero delle lesioni, non raggiungendo la significatività “cifrario” e “velocità di elaborazione” ne sono molto vicini ($p=0.07$ per ambedue)

Il sub test Cifrario con Velocità di elaborazione richiedono coordinazione di movimento, destrezza visuo-motorie e capacità di mantenere l’attenzione: un risultato che potrebbe essere congruente con i dati neurofisiologici riscontrati nella sezione riguardante l’analisi LORETA della P300. Il coinvolgimento cognitivo associato alla malattia anemica e la positività per lesioni alla RMN concorda d'altronde con ampia letteratura (Armstrong et al., 1996; Bernaudin et al., 2000; Brown et al., 2000; Cohen et al., 1994; Craft, et.al. 1993; Schgatz et al., 1999; Watkins, et al., 1998). Un limite del nostro studio è l’assenza del gruppo di controllo. Di tale assenza soffre ed è segnalata nella Meta-Analysis riportata dal Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD). Il problema risiede nella difficoltà di reperire gruppi di controllo simili per età, etnia, ed estrazione socio-culturale.

6 VALUTAZIONE NEUROFISIOLOGICA

6.1 MATERIALI E METODI

In un sottogruppo di 14 bambini in cui si disponeva sia della RMN che dei tests neuropsicologici è stata eseguita la P300. Dei 14 bambini, 7 presentavano Infarti Silenti. La popolazione di bambini SCD è stata confrontata con una popolazione di bambini sani, di età sovrapponibile.

6.1.1 Potenziali Evocati

Dalla superficie dello scalpo è possibile registrare, in modo non invasivo, attività elettrica cerebrale spontanea (EEG) che si presenta sotto forma di onde di diversa frequenza. Sfruttando le tecniche di “*averaging*” (Dawson,1954) è possibile estrarre dall’attività spontanea EEG i potenziali evocati (PE) in risposta a determinati stimoli. I PE si presentano sotto forma di onde positive (P) o negative (N), con determinata ampiezza (μV) e latenza (msec).

I PE si distinguono in due tipi fondamentali :

stimolo-correlati ed evento-correlati o ERP (Event-Related Potentials). I primi indicano la risposta neuronale legata ad uno stimolo di tipo sensoriale: visivo, acustico, motorio e risultano insensibili alle variazioni delle funzioni superiori. Gli ERP invece sono dipendenti dal contenuto informativo dello stimolo (Sutton et al. 1965): compaiono solo quando il soggetto presta attenzione allo stimolo e quando lo stimolo è indicato per convenzione come significativo (stimolo target) rispetto ad altri stimoli che diversamente non lo sono (stimoli non target). Diversi ERPs sono stati identificati da vari autori in base alla latenza, alla modalità di elicitazione, alle caratteristiche degli stimoli e ai paradigmi elaborati.

L’ERP più utilizzato e più conosciuto è la P300, un potenziale cognitivo correlato ai processi coinvolti nell’aggiornamento delle rappresentazioni della Working Memory .

Il paradigma più semplice utilizzato per ottenere le risposte event-related è il paradigma “Oddball” in cui al soggetto in esame vengono presentate sequenze di due stimoli distinguibili in base alle caratteristiche fisiche. Uno degli stimoli occorre frequentemente (stimolo frequente) e l’altro infrequentemente (stimolo raro). Il paradigma può essere “attivo” o “passivo”: nel primo caso il paziente viene istruito ad attendere ed identificare lo stimolo “*target*” ponendo attenzione

alla differenza tra gli stimoli (per esempio contando il numero di stimoli target); nel secondo caso invece, il soggetto non viene istruito ad identificarlo.

La scelta del tipo di paradigma attivo o passivo dipende dal tipo di processo cognitivo che si vuole andare ad indagare. E' chiaro che se al soggetto viene chiesto di "attendere" lo stimolo significativo, identificarlo e contarlo, vengono attivati processi attentivi diversi e la risposta sarà diversa.

Lo stimolo frequente evoca una N100 considerata il correlato precoce dei processi attentivi (Hansen and Hillyard 1988). Lo stimolo raro evoca oltre la N100 anche una N200 e la P300 che compare come un'ampia deflessione positiva (5-10 μ V), attorno ai 300 millisecondi, simmetrica, massima sulle regioni centro-parietali. L'attenzione ha un ruolo fondamentale nel determinare la risposta.

A volte la P300 si può presentare sotto forma di due onde: una chiamata P3a più precoce a distribuzione prevalentemente fronto-centrale e una chiamata P3b a distribuzione centro-parietale. Variabili fisiologiche come l'età e la deprivazione di sonno possono incidere sull'aumento di latenza ed ampiezza della P300. La latenza e in minor misura, l'ampiezza della P300 variano proporzionalmente all'età dei soggetti. Le latenze minime si hanno nella decade tra i 10 e i 20 anni, con un incremento di latenza media di 1,5 -1,8 msec per anno, a partire dalla seconda decade (Gooding,1978). L'ampiezza invece tende a diminuire con l'età (Oken, Kaye 1992). L'ampiezza è legata anche alla modalità di somministrazione degli stimoli: più aumenta l'intervallo tra stimolo raro e stimolo frequente, più attenzione deve porre il soggetto al compito e più la risposta risulta ampia. Si pensa quindi, che l'ampiezza sia proporzionale anche all'impegno necessario per aggiornare lo schema mnesico richiesto (Kutas et al. 1977).

Negli anni la P300 è stata studiata in molte malattie neurologiche degenerative ed in molte patologie psichiatriche come l'autismo, la schizofrenia, la depressione.

6.1.2 Acquisizione dati P300

E' stato utilizzando un apparecchio digitale Mizar EBNEURO.

La registrazione è stata fatta tramite l'applicazione di una cuffia precablata a 19 elettrodi (Fp1, Fp2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2, F7, F8, T3, T4, T5, T6, Fz, Cz, Pz) disposti sullo scalpo secondo il sistema internazionale 10/20. Tutti gli elettrodi, in derivazione monopolare, sono stati riferiti ad una referenza

biauricolare. L'elettrodo di terra è stato posto in Oz. Le impedenze sono state mantenute al di sotto dei 5K Ω .

E' stato dedicato un canale Elettrooculografico (EOG) per discriminare l'artefatto dovuto a movimenti oculari.

Gli stimoli sono stati erogati attraverso una cuffia audio opportunamente schermata.

Al bambino dopo dettagliata spiegazione della prova, è stato chiesto di prestare particolare attenzione agli stimoli "target" riconoscerli e contarli.

I parametri di registrazione sono stati:

Banda passante di 0,1-100Hz campionamento in frequenza pari a 1024Hz.

Tempo di analisi: 700ms con un ritardo di -1 div. Pre-trigger.

Gli stimoli sono stati toni acustici, così differenziati:

stimolo raro 2000Hz, stimolo frequente 1000Hz con un rapporto F/R ratio = 7.

ISI (intervallo interstimolo): Min 1020 e Max 110

Tutti i pazienti sottoposti al test hanno collaborato e ben tollerato la prova.

La durata totale del Test è stata di circa 40 min.

6.1.3 Low Resolution Tomography (LORETA)

Il software Loreta, software accademico di libero accesso, si pone come obiettivo la soluzione del "problema inverso dell'elettroencefalografia". Si tratta cioè di risalire dal potenziale rilevato in corteccia, alla distribuzione di cariche che l'ha generato (Pascual-Marqui R.D., et. al. 1994) Questo è un problema che permette soluzioni solo imponendo particolari vincoli ragionevoli alle equazioni di soluzione. Il problema inverso può essere visto "nel dominio del tempo" (cioè cercare la distribuzione di carica che ha generato ad esempio un potenziale evocato) oppure "nel dominio delle frequenze" (cioè cercare la distribuzione di carica che ha generato una certa attività ritmica, vista come banda di frequenza).

Nel nostro studio abbiamo cercato la soluzione del problema inverso nel dominio del tempo, abbiamo cioè cercato i generatori corticali della P300.

Il modello su cui si basa Loreta comprende cranio, cuoio capelluto e compartimento cerebrale. Il compartimento cerebrale è stato ristretto alla sostanza grigia corticale/ippocampo ed è stato adattato alle mappe cerebrali di Talairach (Talairach J., et. al. 1988). Questo compartimento comprende 2934 voxels. La

ricostruzione tridimensionale è reference-free.

Il programma provvede a fornire per 6239 voxels di 5 mm di risoluzione, il valore del test statistico usato e fornisce quali sono i valori soglia per il test statistico ad una ed a due code e per $p < 0.1$, $p < 0.05$ e $p < 0.01$.

La seguente tabella mostra in quanti voxels le varie aree di Brodmann sono rappresentate dal programma

BA	Descrizione	SIN	N voxels	
			DX	Centro
1	Somatosensoriale Primaria	9	9	0
2	Somatosensoriale Primaria	43	49	0
3	Somatosensoriale Primaria	72	72	0
4	Motoria Primaria	69	64	1
5	Somatosensoriale Associativa	40	41	9
6	Premotoria	263	274	13
7	Somatosensoriale Associativa	186	183	25
8	Campo oculare frontale	74	89	9
9	Prefrontale dorsolaterale	124	135	9
10	Prefrontale anteriore	136	134	2
11	Orbitofrontale	115	122	0
12	Orbitofrontale	0	0	0
13	Insula	125	117	0
17	Visiva primaria	36	39	2
18	Visiva secondaria	145	143	28
19	Visiva associativa	186	179	2
20	Giro temporale inferiore	109	112	0
21	Giro temporale medio	105	125	0
22	Giro temporale superiore	88	93	0
23	Cingolato posteriore ventrale	15	18	15
24	Cingolato anteriore ventrale	61	69	20
25	Prefrontale ventromediale	16	19	8
27	Corteccia piriforme	7	9	0
28	Corteccia entorinale	21	20	0
29	Cingolato retrosplenio	5	4	0
30	Parte della corteccia cingolata	37	37	3
31	Cingolato posteriore	80	90	29
32	Cingolato anteriore dorsale	70	76	10
33	Cingolato anteriore dorsale	2	3	2
34	Entorinale anteriore	17	16	0
35	Peririnale	13	13	0
36	Paraippocampo	30	26	0
37	Giro fusiforme	96	91	0
38	Temporopolare	76	88	0
39	Giro angolare	77	64	0
40	Giro sopramarginale	189	188	0
41	Auditiva di associazione	27	28	0
42	Auditiva di associazione	19	20	0
43	Gustatoria primaria	14	12	0
44	Parte opercolare	28	28	0
45	Parte triangolare	29	34	0
46	Prefrontale dorsolaterale	20	25	0
47	Giro prefrontale inferiore	107	113	0
TOT	6239	2981	3071	187

Grazie a tale tabella è stato possibile calcolare la percentuale di voxels di una determinata area, (in fondo la percentuale di volume di una determinata area di Brodman) con valori significativamente diversi nei gruppi in analisi, rispetto a vari livelli di significatività.

6.2 ANALISI STATISTICA

Sono state condotti due tipi di analisi statistiche. Nella prima si è analizzata la P300 cercando eventuali differenze significative nella forma d'onda (latenza ed ampiezza) rispetto ai tre gruppi. In questa analisi ci si è avvalsi della analisi della Varianza per misure ripetute.

Nella seconda invece, si è cercato di rilevare differenze significative nei generatori responsabili della formazione della P300 nei tre gruppi (analisi con LORETA)

Il test statistico utilizzato per tale analisi è stato il T con randomizzazione, in modo da ottenere il livello di probabilità corretto per confronti multipli (cioè il numero di voxel considerati) e libero da qualsiasi richiesta di gaussianità. Il livello di significatività statistica prefissato è stato $p < 0.05$.

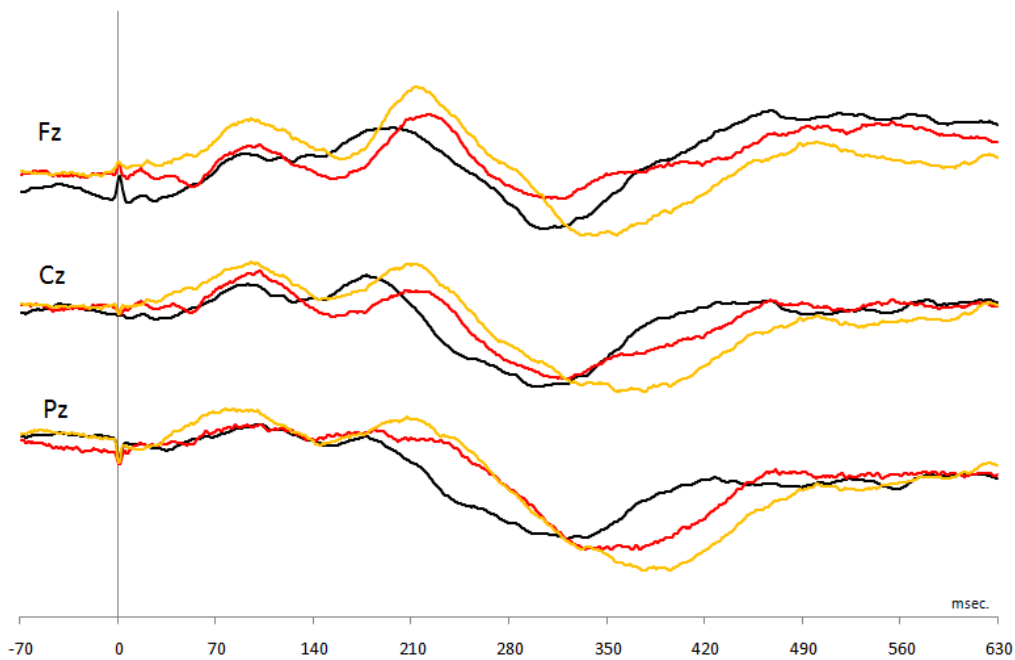
6.3 RISULTATI

L'età media nelle tre popolazioni (controlli, bambini SCD con e senza IS) non era significativamente diversa (analisi della varianza, $F=0.28$, $p=0.76$), come risulta dalla tabella sottostante:

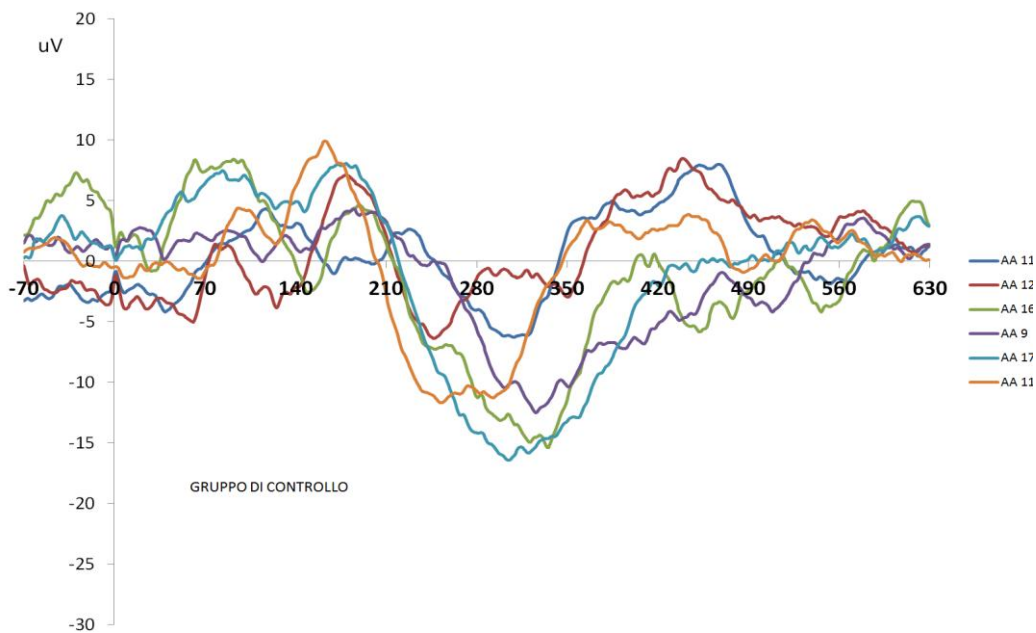
GRUPPO	ETA' (Media+S.D.)	N casi
SCD senza infarti	11,86±2,41	7 (F=0, M=7)
SCD con infarti	11,43±3,41	7 (F=5, M=2)
CONTROLLI	12,67±3,14	6 (M=3, F=3)
Tutti	11,95±2,89	20

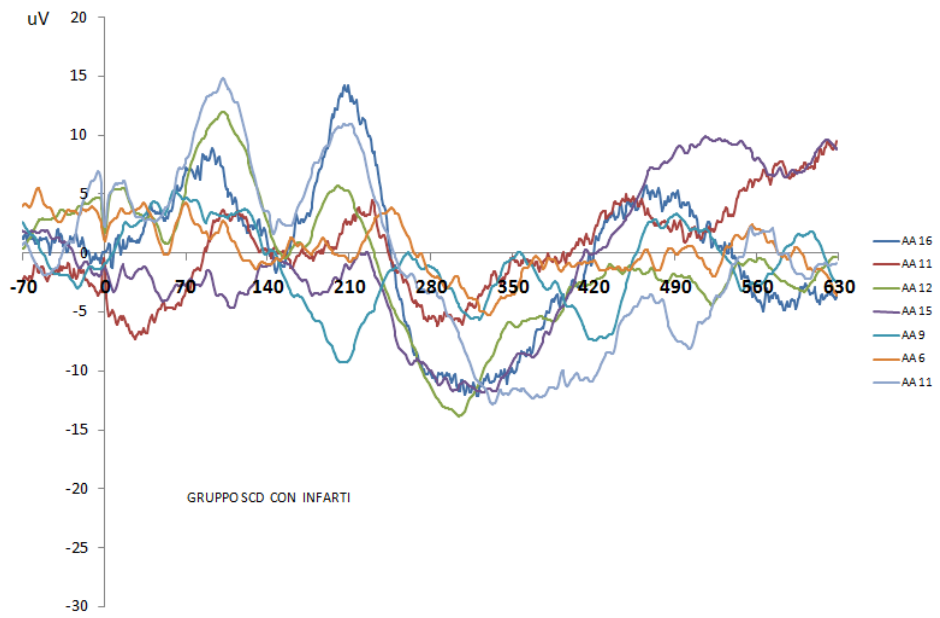
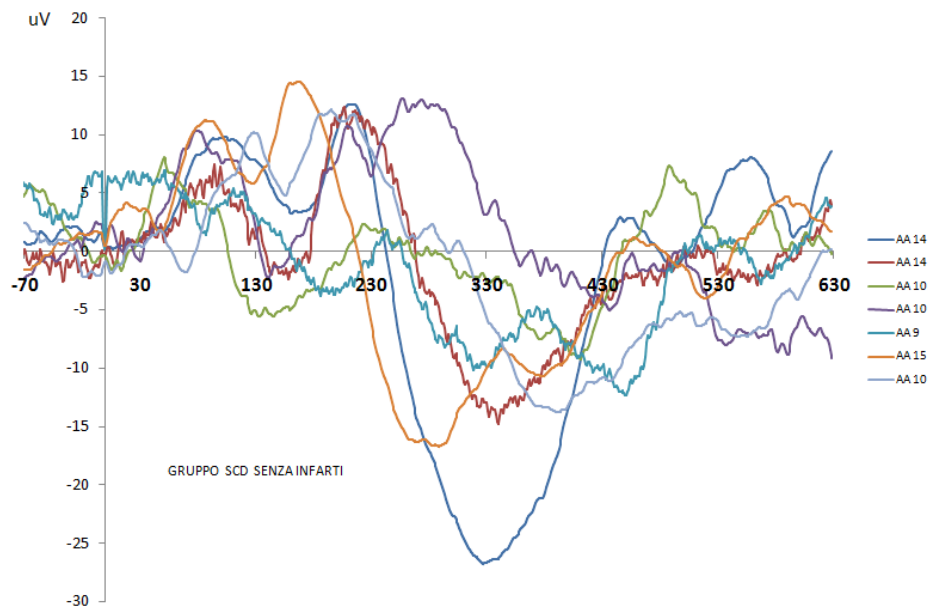
6.3.1 Analisi della Varianza per misure ripetute

Il grand average della P300 nei tre gruppi (Nero = Controlli ; Rosso = SCD con infarti; Giallo = SCD senza infarti) è riportato sotto, per le tre derivazioni centrali: Fz, Cz e Pz



Nelle figure sottostanti vengono riportate le P300 registrate in Cz per rispettivamente il gruppo di controllo, il gruppo senza infarti silenti e con infarti silenti. Vengono altresì riportate le età dei bambini.





L'analisi è stata condotta considerando la P300 registrata in Cz.

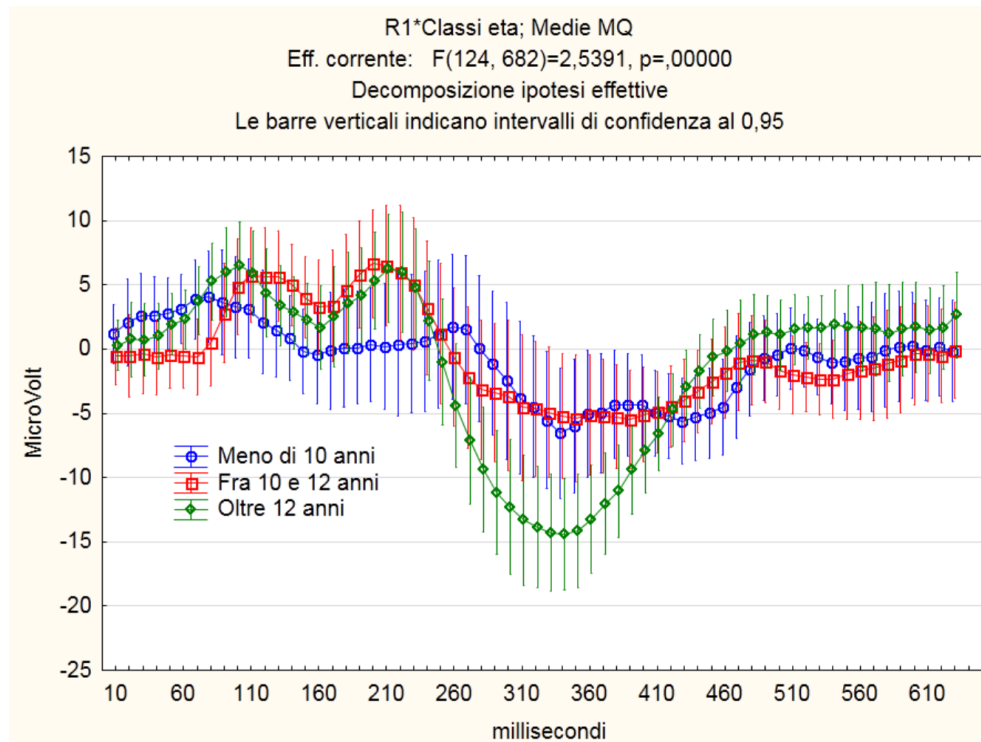
A questo scopo, il tracciato è stato segmentato in bins risultanti ciascuno dalla media dei valori di 10 millisecondi. Si sono quindi ottenuti 70 bins da 10 millisecondi ciascuno. Come effetto intra soggetti si sono considerati i BINS (effetto del tempo), e come effetti fra soggetti è stato considerato il GRUPPO (SCD con o senza infarti e controlli) e l'età. L'età è stata categorizzata come segue:

Gruppo A = età fino a 10 anni (6 casi)

Gruppo B = età fra 10 e 12 anni (7 casi)

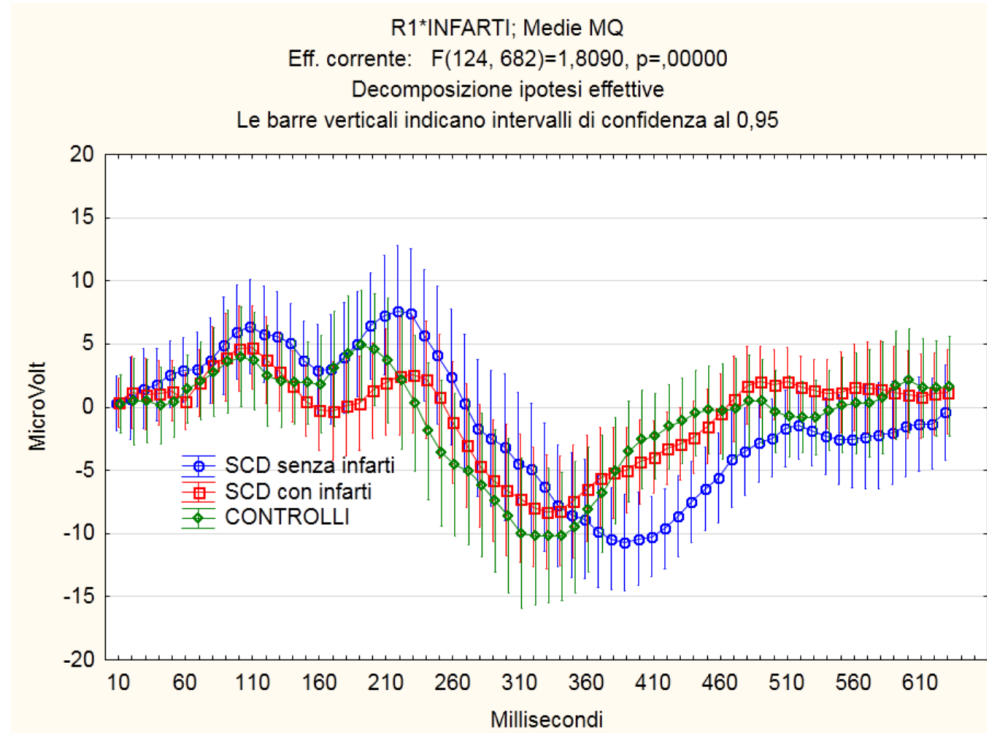
Gruppo C = età superiore a 12 anni (7 casi)

L'effetto dell'età è risultato significativo, come mostrato nella seguente figura



Si può notare come l'ampiezza della P300 tenda ad aumentare e come il picco tenda ad essere più definito, all'aumentare dell'età.

Anche l'effetto di appartenenza al gruppo è risultato significativo, come appare dalla seguente figura:



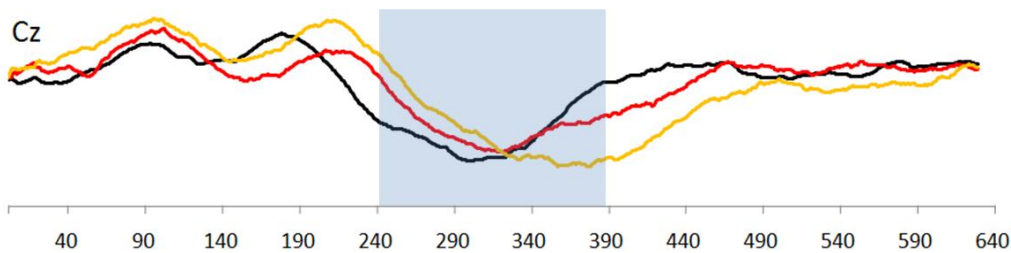
Si può notare come rispetto ai controlli, il gruppo SCD con infarti abbia una ampiezza della P300 minore ed un picco meno definito; il gruppo SCD senza infarti presenta una ampiezza sovrapponibile a quella dei controlli, ma la latenza appare maggiore.

E' inoltre risultata significativa l'interazione GRUPPO+ETA' ($p=0.03$)

6.3.2 Analisi con LORETA

La Low Resolution Tomography è stata applicata all'analisi di sorgente del segnale nei tre gruppi.

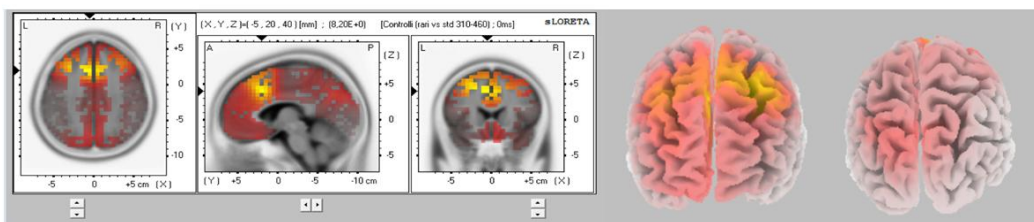
La prima analisi ha preso in considerazione le sorgenti di attività nell'arco temporale compreso fra 240 e 390 millisecondi ed ha confrontato il gruppo dei controlli vs l'intero gruppo SCD. La figura sottostante mostra i risultati ottenuti.



Controlli

Frontale

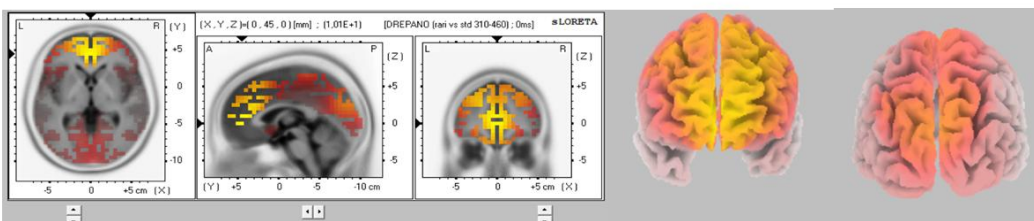
Occipitale



SCD (intero gruppo)

Frontale

Occipitale



La seguente tabella mostra le aree attivate nel gruppo di controllo. Essa riporta la percentuale di attivazione della corrispondente area di Brodmann e il T score medio, variabile seconda la quale è stata ordinata la tabella stessa.

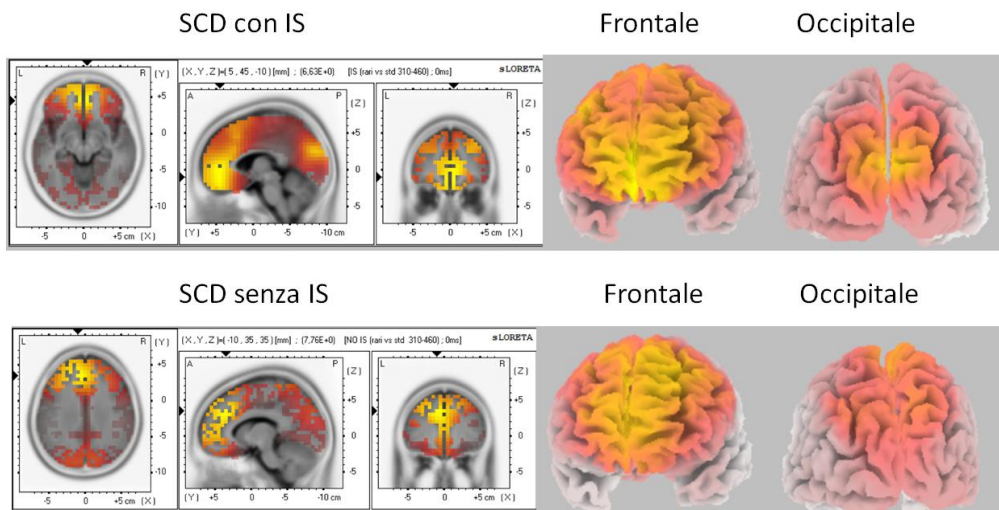
La significatività è $p < 0.05$ con test a due code.

BA	Descrizione	Attivazione percentuale			T score		
		SIN	DX	MEDIA	SIN	DX	MEDIA
8	Campo frontale oculare	90,54	85,39	87,73	7,26	6,65	6,95
32	Cingolato anteriore dorsale	51,43	52,63	52,05	6,93	6,75	6,84
6	Premotoria	19,01	10,58	14,71	6,55	6,35	6,45
24	Cingolato anteriore ventrale	26,23	27,54	26,92	6,46	6,41	6,43
9	Prefrontale dorsolaterale	37,10	37,04	37,07	6,47	6,26	6,36
33	Cingolato anteriore dorsale	100,00	100,00	100,00	6,13	6,30	6,21

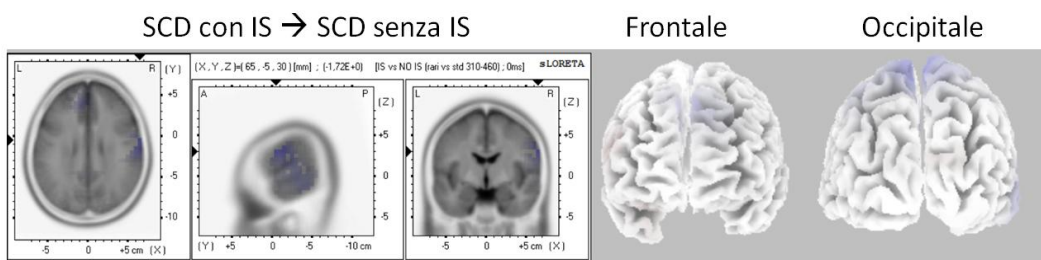
La sottostante tabella riporta invece i risultati relativi al gruppo SCD (p<0.01 a due code).

BA	Descrizione	Attivazione percentuale			T score		
		SIN	DX	MEDIA	SIN	DX	MEDIA
32	Cingolato anteriore dorsale	100,00	100,00	100,00	9,00	8,82	8,91
10	Prefrontale anteriore	100,00	100,00	100,00	8,99	8,37	8,68
8	Campo oculare frontale	100,00	100,00	100,00	8,62	8,20	8,41
9	Prefrontale dorsolaterale	100,00	100,00	100,00	8,41	7,89	8,15
33	Cingolato anteriore dorsale	100,00	100,00	100,00	7,96	8,09	8,02
11	Orbitofrontale	100,00	100,00	100,00	7,86	7,39	7,63
46	Prefrontale dorsolaterale	100,00	100,00	100,00	7,60	6,43	7,01
7	Somatosensoriale Associativa	100,00	100,00	100,00	6,14	6,78	6,46
24	Cingolato anteriore ventrale	100,00	100,00	100,00	6,42	6,44	6,43
18	Visiva secondaria	100,00	100,00	100,00	6,14	6,21	6,17
17	Visiva primaria	100,00	100,00	100,00	6,08	6,20	6,14
5	Somatosensoriale Associativa	100,00	100,00	100,00	5,52	6,41	5,96
6	Premotoria	94,30	91,61	92,92	5,89	5,99	5,94
19	Visiva associativa	100,00	100,00	100,00	5,91	5,94	5,92
25	Prefrontale ventromediale	100,00	100,00	100,00	5,88	5,80	5,84
31	Cingolato posteriore	97,50	100,00	98,82	5,40	5,73	5,57
45	Broca	100,00	100,00	100,00	6,05	5,04	5,54
30	Parte della corteccia cingolata	100,00	97,30	98,65	5,51	5,35	5,43
47	Giro prefrontale inferiore	100,00	100,00	100,00	5,61	4,97	5,29
4	Motoria Primaria	72,46	73,44	72,93	5,03	5,09	5,06
3	Somatosensoriale Primaria	80,56	81,94	81,25	4,86	5,24	5,05
23	Cingolato posteriore ventrale	60,00	88,89	75,76	5,24	4,77	5,00
29	Cingolato retrosplenio	100,00	100,00	100,00	4,90	4,77	4,84
1	Somatosensoriale Primaria	66,67	66,67	66,67	4,82	4,82	4,82
13	Insula	36,00	29,91	33,06	4,94	4,64	4,79
44	Broca	89,29	60,71	75,00	5,12	4,37	4,75
39	Giro angolare (Wernicke)	100,00	100,00	100,00	4,67	4,81	4,74
2	Somatosensoriale Primaria	46,51	69,39	58,70	4,50	4,73	4,61
37	Giro fusiforme	92,71	75,82	84,49	4,47	4,38	4,43
40	Giro sopramarginale (Wernicke)	39,15	77,66	58,36	4,18	4,44	4,31
38	Temporopolare	90,79	78,41	84,15	4,38	4,13	4,25

Considerando separatamente i due gruppi con SCD, si ottengono i seguenti risultati:



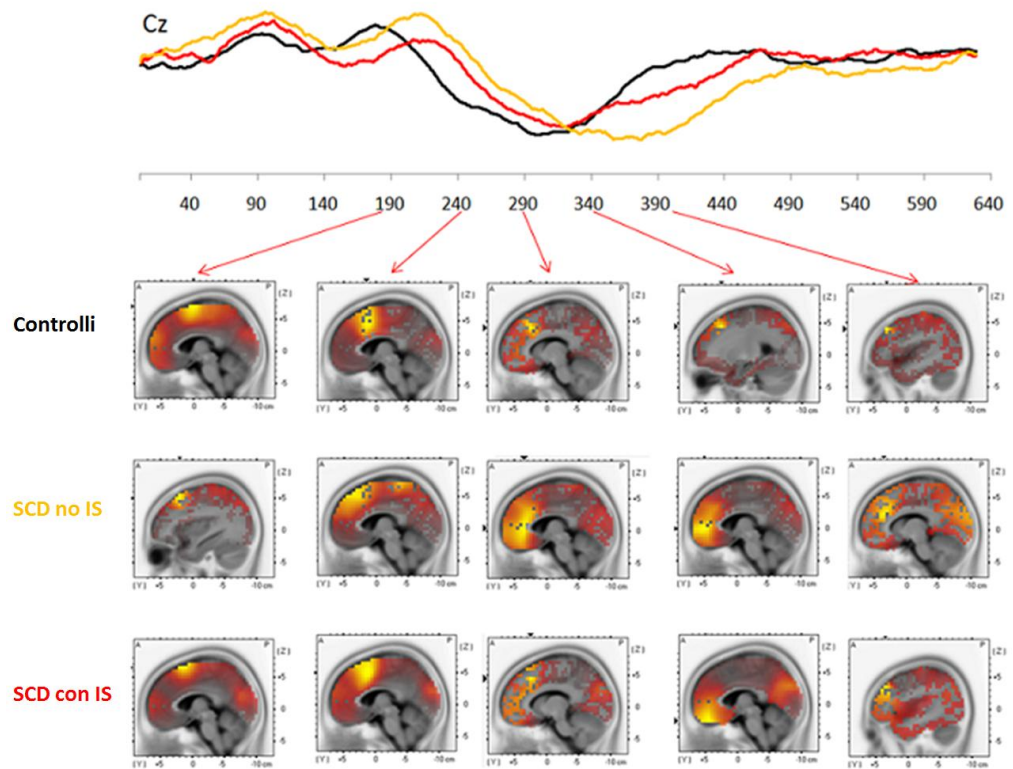
Il confronto eseguito fra il gruppo SCD con e senza infarti non ha identificato alcuna differenza statisticamente significativa, come appare evidente dalla figura sottostante:



Si è voluto seguire l'attivazione corticale dei tre gruppi nel tempo.

A questo scopo, sono stati analizzati cinque consecutivi intervalli di tempo di ampiezza pari a 50 millisecondi, per ciascun gruppo. Il primo intervallo prendeva in esame le sorgenti attive fra 190 e 240 millisecondi mentre l'ultimo era relativo all'intervallo di tempo compreso fra 390 e 440 millisecondi: in pratica si è seguito con una risoluzione temporale di 50 msec l'intero svolgimento della risposta evocata P300. Il test statistico era il T per dati appaiati e confrontava le sorgenti di attività elettrica responsabili del potenziale evocato dagli stimoli rari rispetto a quello evocato dagli stimoli standard.

La figura sottostante mostra in maniera sintetica come si è svolta l'analisi e pone a confronto i risultati ottenuti (limitandosi alla proiezione assiale) nei tre gruppi, collocandoli per comodità, rispetto al potenziale registrato in CZ nei tre gruppi.



Ad una prima analisi visiva si apprezza che:

nell' intervallo 190-240: esiste una attività frontale simile nei tre gruppi, un pò meno evidente nel gruppo SCD senza IS;

nell' intervallo 240-290: l'attività frontale è pressochè sovrapponibile nei tre gruppi;

nell' intervallo 290-340: l'attività frontale è più presente nel gruppo SCD senza infarti e in tutti i tre gruppi compare attività parieto-occipitale;

nell' intervallo 340-390: l'attività frontale continua molto evidente nei due gruppi SCD mentre è limitatissima nel gruppo controlli;

nell' intervallo 390-440: l'attività frontale, per quanto meno evidente, continua ancora nel gruppo SCD.

6.4 DISCUSSIONE

Valutazione neurofisiologica

In questa sezione si è studiato un gruppo di 14 bambini SCD: 12 di essi presentavano infarti silenti. Il gruppo di controllo era costituito da 6 bambini normali, con età distribuita come nel gruppo di pazienti. La valutazione neurofisiologica scelta è stata la P300, una misura globale di funzionalità cognitiva che coinvolge la capacità attentiva, di discriminazione e la working memory.

La P300 è stata analizzata sia dal punto di vista morfologico che dal punto di vista delle sorgenti responsabili della formazione del potenziale evocato. A nostra conoscenza questo è il primo lavoro che valuta l'impatto della SCD dal punto di vista neurofisiologico tramite l'uso della Low Resolution Tomography.

La prima analisi è stata condotta considerando la P300 registrata in Cz. E segmentando il tracciato in bins risultanti ciascuno dalla media dei valori di 10 millisecondi. E' stata quindi usata l'Analisi della varianza per misure ripetute considerando come effetto intra soggetti i BINS (effetto del tempo), e come effetti fra soggetti il gruppo (SCD con o senza infarti e controlli) e l'età categorizzata (fino a 10, da 10 a 12, oltre 12 anni). E' stato riscontrato un effetto significativo nell'interazione fra il gruppo (controlli, SCD con e senza IS) e il tempo, fra l'età categorizzata e il tempo e fra il gruppo e l'età. Ai fini del nostro lavoro, l'interazione più importante è la prima e dimostra una significativa differenza nelle forme d'onda nei tre gruppi. Rispetto ai controlli, il gruppo SCD con infarti presenta una ampiezza della P300 minore ed un picco meno definito; il gruppo SCD senza infarti presenta una ampiezza sovrapponibile a quella dei controlli, ma la latenza appare maggiore. Questo sembra suggerire un rallentamento nella velocità di esecuzione del compito attentivo di discriminazione fra stimoli target e stimoli standard, ma nulla ci dice sull'eventuale differenza nella distribuzione dei generatori corticali della P300 nei tre gruppi. Interessante è il rilievo che esiste un effetto significativo nell'interazione fra età e gruppo. Questo dato potrebbe essere messo in relazione ai dati di letteratura che riportano la presenza di rischio di Infarti Silenti già nei primissimi anni di vita: tali danni potrebbero essere responsabili di una diversità nelle tappe maturative che renderebbe ragione dell'effetto significativo di interazione riscontrato nel nostro gruppo. Si

aprirebbero quindi nuovi orizzonti di indagine nella valutazione delle tappe maturative nei bambini con SCD. Ovviamente tali studi necessitano di numerosità campionarie adeguate.

La seconda parte dell'analisi ha cercato di identificare le sorgenti corticali responsabili della P300 e di confrontare i controlli → SCD e all'interno degli SCD i pazienti con e senza Infarti Silenti. Il confronto fra il gruppo di controllo ed il gruppo SCD ha mostrato che le aree identificate come responsabili dell'origine del segnale sono principalmente le aree frontali (BA 6 8 9) e le aree del Cingolato Anteriore Dorsale (BA 33 e 34) nel gruppo di controllo. Nel gruppo SCD oltre a tali aree vengono attivate anche altre aree frontali (BA 46, 47, 25) e altre aree del Giro Cingolato (BA 32, 24, 31, 30, 23). Vengono inoltre attivate le aree Centrali e Parieto Occipitali (BA 3, 4, 7, 17, 18, 19, 40), l'Insula e il Giro Fusiforme.

Indipendentemente dai due gruppi, le aree identificate sono in linea con i risultati della letteratura (Bocquillon P. 2011, Volpe U. 2007) che propongono un esteso network Fronto-Parietale con un generatore target-specifico a livello del Cingolato Anteriore. Sembrerebbe quindi che a livello di localizzazione dei generatori della P300, non ci fossero differenze significative: quello che appare è un coinvolgimento più ampio nel gruppo con SCD. Questo può essere dovuto ad un bias legato alla numerosità campionaria (il gruppo di controllo conta su 6 casi, mentre il gruppo SCD su 14 e quindi il livello di significatività raggiunto dalle aree è più alto) e/o ad un effettivo aumento di risorse allocate a livello di network nel gruppo SCD, legato alla plasticità neuronale attivata per far fronte ad eventuali deficit.

Il confronto eseguito all'interno del gruppo SCD, non ha mostrato alcuna differenza significativa fra i bambini con IS e quelli senza IS. Questo dato potrebbe essere dovuto alla limitata numerosità campionarie (errore di tipo Beta) e/o al fatto che la presenza di Infarti Silenti sia solo la punta di un iceberg: essi si inseriscono come fatti locali in un contesto di alterazione generale e non vanno ad influire significativamente su un vasto ed alterato network di base, di cui la P300 non può che vedere la totalità.

L'analisi LORETA è stata inoltre condotta su tempi ristretti (50 msec.) e consecutivi, in modo da seguire le attivazioni corticali nel tempo. Sono state considerate 5 finestre temporali consecutive a partire a 190 msec, fino a 440 e si sono confrontati i vari periodi nei tre gruppi. E' emerso che non esiste differenza

all'interno del gruppo SCD e che appare evidente come il gruppo di controllo esaurisca l'attività dei generatori nel periodo 290-340 msec, mentre nel gruppo SCD tale attività si prolunghi di almeno 50 msec, con un network più vasto.

Sembrerebbe quindi che i generatori attivati fossero gli stessi (con una maggiore ampiezza nel gruppo SCD) e che l'attività nel gruppo SCD continuasse più a lungo. Questo renderebbe ragione dell'aumento di latenza del picco della P300 nel gruppo SCD. I nostri risultati sembrano supportare l'ipotesi di Triantafyllou N.I. (1992) che in uno studio condotto tramite l'uso della P300 in bambini talassemici spiegava il rallentamento nel picco della P300 solo come un rallentamento nella velocità di processazione dell'informazione.

Riprendendo l'ipotesi di una alterazione generale del microcircolo che induca sofferenza in aree corticali di diversa sensibilità agli insulti metabolici e di un conseguente reclutamento compensativo di più vaste aree in termini di network, ci si può spiegare sia la maggior vastità di aree coinvolte, sia la loro più prolungata attivazione.

7 ANALISI VOLUMETRICA (FREE SURFER)

Lo spessore corticale (Cortical Thickness) può essere un importante marker di abilità cognitive (Sowell ER, 2004; Shaw P, et. al. 2006).

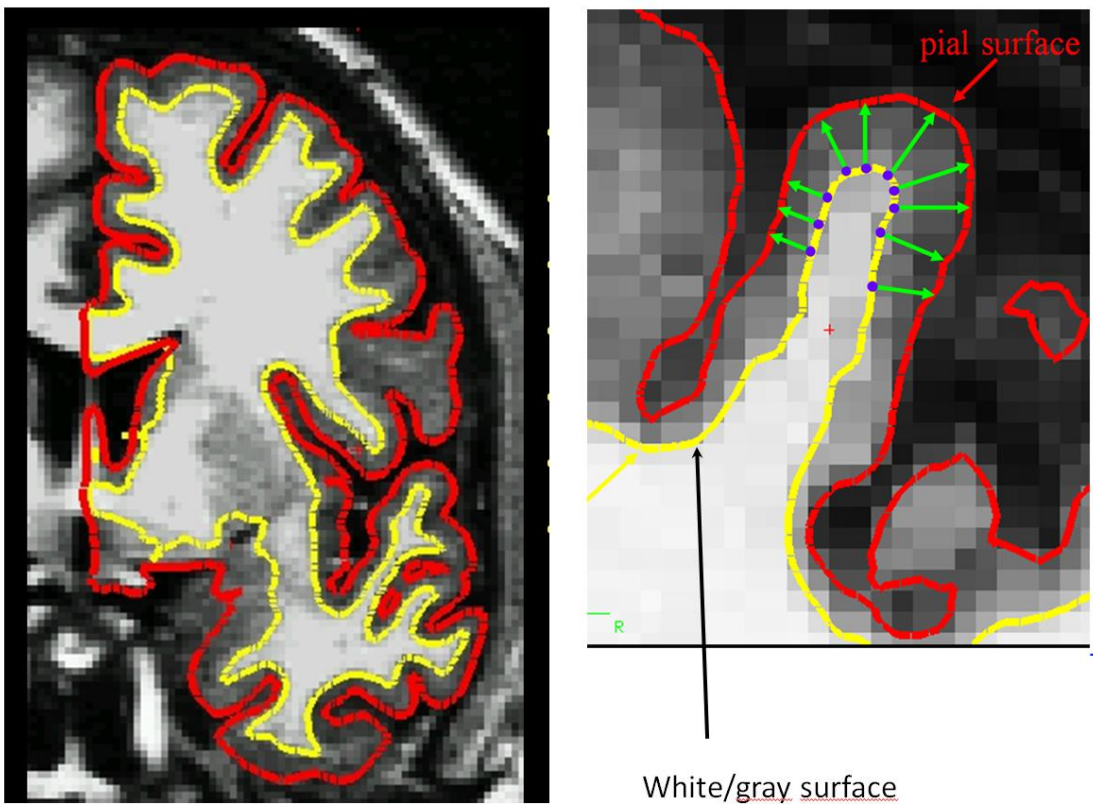
7.1 MATERIALI E METODI

Nel sottogruppo dei 14 pazienti valutati con P300 è stata condotta una analisi strutturale dei dati acquisiti tramite MRI, usando il Software FreeSurfer (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>)

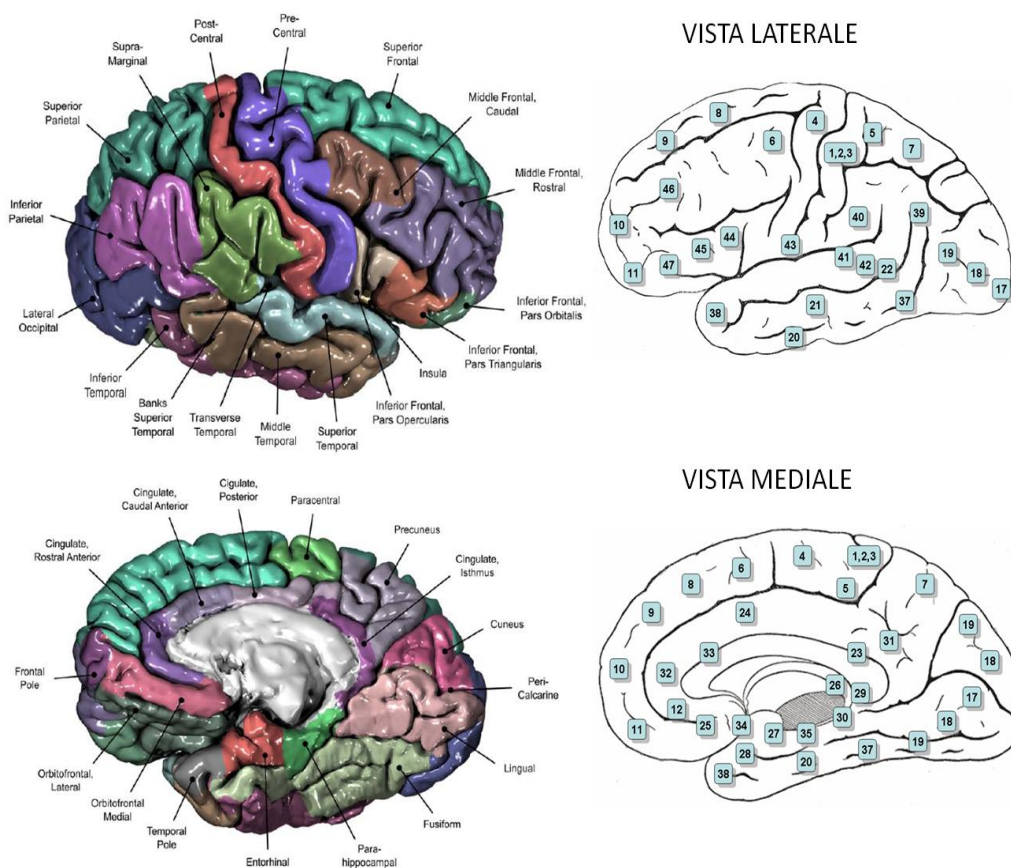
Il programma FreeSurfer fornisce tre misure, per 34 regioni cerebrali (destra e sinistra):

- 1 Volume Corticale suddiviso in ogni sua regione
- 2 Area Corticale della sostanza bianca in ogni sua regione
- 3 Spessore Corticale (Cortical Thickness) in ogni sua regione.

La figura sottostante rappresenta in maniera sintetica come viene calcolata la Cortical Thickness, il volume e l'area della sostanza bianca.



Le 34 aree non sono sovrapponibili alle aree di Brodmann. Esse sono così rappresentate e nominate dal programma.



Tutti i bambini erano stati precedentemente valutati rispondendo ad un semplice questionario Edimburg per identificare la lateralizzazione manuale e sono risultati tutti destrimani.

7.2 ANALISI STATISTICA

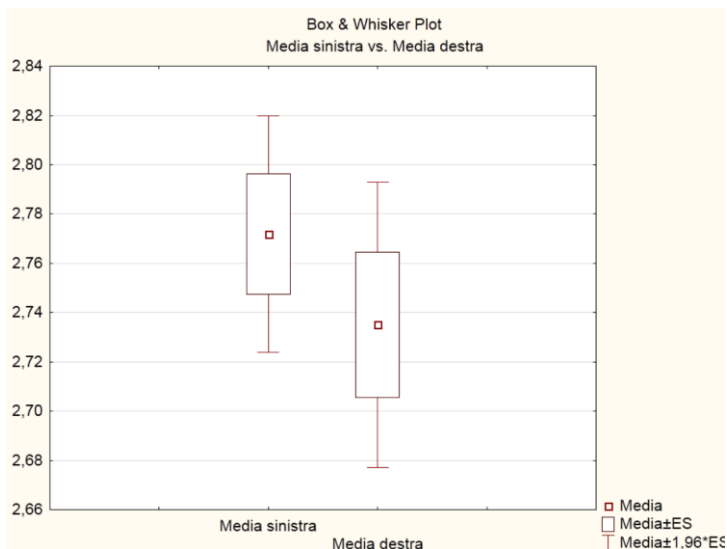
E' stato utilizzato il T di Student per campioni indipendenti e per dati appaiati. L'Analisi della Covarianza è stata utilizzata per tenere conto dell'età (come covariata) e l'Analisi della Varianza per misure Ripetute per valutare l'eventuale effetto di interazione del lato (destro/sinistro) e del gruppo (con IS/ senza IS). Il livello di significatività prefissato è stato $p < 0.05$

7.3 RISULTATI

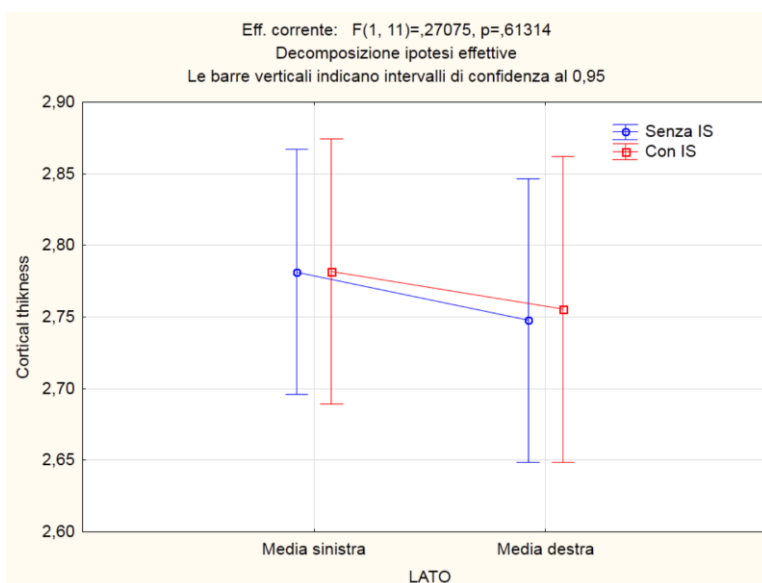
7.3.1 Cortical Thickness

La stima della Cortical Thickness nel gruppo di bambini affetti da Anemia Falciforme con e senza presenza di Infarti Silenti, non ha dato alcuna differenza significativa fra i due gruppi.

Esiste una differenza significativa nella Cortical Thickness media rispetto al lato ($p=0.0003$), essendo la media di destra pari a 2.73 ± 0.11 e quella di sinistra pari a 2.77 ± 0.09 . Il risultato è rappresentato nella figura sottostante.



L'analisi della varianza per misure ripetute non ha mostrato nessun effetto significativo ($p=0.61$) nell'interazione LATO+GRUPPO (presenza/assenza di Infarti Silenti), come mostrato nella sottostante figura.



7.3.2 Volume corticale

Si sono trovate alcune aree con volumi significativamente diversi rispetto ai due gruppi, come mostrato nella seguente tabella. Fra parentesi vengono riportate le corrispondenti aree di Brodmann. Naturalmente non esiste una perfetta tabella di conversione.

	Media		p	Dev.Std.		ANCOVA
	Senza IS	Con IS		Senza IS	Con IS	
lh_cuneus_volume (BA 18-19)	3398	2765	0,017458	493	269	0.02
lh_lateraloccipital_volume (BA 17,18,19)	12903	10606	0,001378	978	966	0.002
lh_rostralmiddlefrontal_volume (BA 10 11 46)	23510	19789	0,002327	1669	1734	0.002
rh_cuneus_volume (BA 18-19)	3576	3007	0,015292	421	260	0.014
rh_entorhinal_volume (BA 34 28)	1593	1310	0,039740	236	196	0.045
rh_fusiform_volume (BA 37)	10566	9090	0,001352	806	274	0.002
rh_lateraloccipital_volume (BA 17,18,19)	12612	10512	0,024228	1773	910	0.03
rh_insula_volume (BA 13)	7783	7090	0,048539	600	514	0.06

E' da notare che due aree appaiono con volumi significativamente diversi sia a destra che a sinistra. In tutti i casi i volumi sono maggiori nel gruppo senza infarti rispetto a quello con infarti. L'analisi della covarianza, condotta considerando come covariata l'età, mostra che solo nel caso dell'insula si perde la significatività.

7.3.3 Area della Sostanza Bianca

Il totale della sostanza bianca è maggiore sia a destra che a sinistra nel gruppo senza Infarti Silenti: tale differenza non raggiunge tuttavia la significatività statistica (vd tabella sottostante).

	Media		p	Dev.Std.	
	Senza IS	Con IS		Senza IS	Con IS
lh_WhiteSurfArea_area	89501,10	83985,82	0,174227	7653,142	5671,333
rh_WhiteSurfArea_area	89327,70	83760,08	0,197339	8088,733	6204,977

Analizzando ciascuna area si ottiene la seguente tabella

	Media		p	Dev.Std.	
	Senza IS	Con IS		Senza IS	Con IS
lh_cuneus_area (BA 18-19)	1531,43	1275,83	0,021405	215,288	95,010
lh_lateraloccipital_area (BA 17,18,19)	5214,71	4371,67	0,001700	278,798	452,006
lh_rostralmiddlefrontal_area (BA 10 11 46)	7060,14	6072,17	0,001494	386,460	463,347
lh_supramarginal_area (BA 40)	4303,57	3812,67	0,005545	285,078	217,700
lh_temporalpole_area (BA 38)	523,14	446,50	0,020661	59,720	38,051
rh_cuneus_area (BA 18-19)	1672,43	1421,67	0,013522	177,901	117,636
rh_entorhinal_area (BA 34 28)	374,14	297,50	0,014475	52,626	40,560
rh_fusiform_area (BA 37)	3299,00	2901,83	0,010556	274,213	168,238
rh_lateraloccipital_area (BA 17,18,19)	4995,14	4197,00	0,036496	622,899	577,663
rh_lingual_area (BA 18)	3237,29	2724,67	0,046621	514,180	233,789

Calcolando la percentuale sul totale della sostanza bianca, si ottiene il seguente risultato:

	Media		p	Dev.Std.	
	Senza IS	Con IS		Senza IS	Con IS
lh_lateraloccipital_area (BA 17,18,19)	5,8459	5,19952	0,003658	0,336611	0,289698
lh_rostralmiddlefrontal_area (BA 10 11 46)	7,9097	7,22902	0,001777	0,354718	0,213254
rh_lateraloccipital_area (BA 17,18,19)	5,5781	5,00417	0,017503	0,237295	0,482283

Per quanto riguarda le aree sottocorticali è stata trovata una differenza significativa nel Putamen sia a destra che a sinistra

7.4 DISCUSSIONE

Analisi volumetrica

L'analisi strutturale, condotta attraverso l'uso del programma "Free Surfer", ha identificato una differenza dello spessore corticale rispetto al lato ma non rispetto all'appartenenza al gruppo con o senza Infarti Silenti. Di più, l'analisi della varianza ha mostrato che l'interazione fra gruppo e lato è risultato non significativo. Questo dato ha mostrato che l'asimmetria destra/sinistra è conservata nella stessa entità rispetto al lato. E' possibile pensare ad un eventuale effetto di dominanza emisferica, essendo tutti i bambini destrimani.

Il volume corticale ha invece mostrato delle differenze significative sia a destra che a sinistra nel cuneato (BA 18, 19) e nell'area latero-occipitale (BA 17, 18, 19). Inoltre solo a sinistra sono state riscontrate differenze significative nella zona mediale rostro frontale (BA 10, 11 e 46) e solo a destra nell'area entorinale (BA 34, 28), fusiforme (BA 37) e dell'insula (BA 13). Tali significatività permangono (con la sola esclusione dell'insula) anche introducendo come covariata l'età.

In tutti i casi, i volumi calcolati erano maggiori nel sottogruppo senza Infarti Silenti. Anche l'area della sostanza bianca ha mostrato differenze significative, presentando valori maggiori nel gruppo senza Infarti Silenti. Le aree ricalcano abbastanza fedelmente quelle trovate significativamente diverse rispetto al volume.

Per quanto riguarda le aree sottocorticali è stata trovata una differenza significativa nel putamen sia a destra che a sinistra, anche in questo caso con volumi ridotti nel gruppo con IS.

Kirk G.R (2009) ha studiato un gruppo di 28 bambini affetti da SCD e li ha confrontati con un gruppo di 28 bambini normali, usando "Free Surfer". I risultati mostrarono una differenza significativa nello spessore della corteccia del precuneo, della regione paracentrale e della regione frontale superiore bilateralmente. L'autore conclude suggerendo che l'alterata perfusione possa influenzare la maturazione corticale.

Nel nostro lavoro purtroppo non esiste il gruppo di controllo e non possiamo quindi verificare i risultati ottenuti dall'Autore e non esiste la possibilità di confrontarci con precedenti lavori della letteratura, essendo questo il primo studio

che cerca di mettere in relazione i volumi corticali con la presenza di IS in bambini SCD.

Tuttavia è stimolante notare che nel nostro studio sono state riscontrate delle differenze significative del volume corticale a livello delle regioni frontali, e del cuneato.

In letteratura è assodato il fatto che le strutture ippocampali siano molto suscettibili all'ipossia. Questo dato non è estato riscontrato nella nostra casistica. Ciò può essere spiegato da un lato dalla mancanza del gruppo di controllo e dall'altro dalla constatazione che il circolo posteriore è meno interessato nella SCD e pertanto è plausibile il riscontro di differenze a livello corticale.

8 CONCLUSIONI GENERALI

La SCD risulta essere una malattia emergente, soprattutto per ragioni di carattere demografico legato ai flussi migratori. E' una malattia multisistemica che porta a danni d'organo molto importanti. Il coinvolgimento cerebrale è estremamente grave, essendo molto precoce e potendo portare a ictus anche in tenera età. Anche quando l'infarto non è clinicamente evidente, possono insorgere Infarti Silenti e diversi studi hanno riportato alterazioni cognitive nei bambini con e senza Infarti Silenti. Lo studio delle alterazioni cerebrali indotte dalla SCD impongono un approccio multidisciplinare al problema. Ciò è stato lo scopo del presente studio che ha combinato le varie discipline: la neurosonologia (TCD e TCCS), la neuroradiologia (RMN, Angio RMN, l'analisi volumetrica tramite il programma "freesurfer"), la neurofisiologia (studio della P300 dal punto di vista morfologico e dal punto di vista della soluzione del problema inverso tramite il programma LORETA) e la neuropsicologia.

Per la discussione dei risultati relativi ai singoli studi si rimanda ai relativi capitoli. Qui è utile sottolineare come le varie discipline, con le loro specificità, abbiano inquadrato armonicamente il problema ed abbiano fornito risultati non contraddittori, anzi ampiamente complementari. Va anche sottolineato che per quanto riguarda l'analisi neurofisiologica e l'analisi volumetrica, il nostro risulta essere il primo studio sull'argomento.

Certamente la multidisciplinarietà è un punto di forza dello studio, ma vanno anche sottolineati i punti deboli. Primo fra tutti la numerosità campionaria. Se per quanto riguarda il confronto TCD e TCCS lo studio presenta la più ampia numerosità campionaria presente in letteratura, per gli studi neurofisiologici e di volumetria, che peraltro come detto prima risultano essere i primi sull'argomento, è sicuramente richiesto un aumento della numerosità. Va anche riconosciuta la mancanza di un gruppo di controllo nello studio volumetrico e neuropsicologico. D'altronde è riportata in letteratura la difficoltà di reclutare gruppi di controllo omogenei per età e condizioni socio-culturali nella SCD.

Da un punto di vista pratico, sarebbe utile la presenza di un centro dedicato alla patologia, organizzato in maniera multidisciplinare ed in grado di affrontare in maniera integrata tutti i vari aspetti della patologia.

Le prospettive future sono praticamente infinite: dallo studio della maturazione cognitiva nei bambini con SCD, allo studio integrato neurofisiologico, tratto grafico e volumetrico per evidenziare i network che presiedono ai processi cognitivi, alla valutazione dell'impatto della terapia nella prevenzione dell'ictus e dell'impairment cognitivo.

BIBLIOGRAFIA

1. A.I.E.O.P. Raccomandazioni per la Gestione della Malattia Drepanocitica in età pediatrica in Italia.
2. AAP Newborn Screening Taskforce. Serving the family from birth to the medical home. Newborn screening: a blueprint for the future. *Pediatrics* 2000;106(Suppl):383-427
3. AAP, Section on Hematology/Oncology Health Supervision for Children with Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 2002; 109(3)
4. Aaslid R. et al. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg.*1982;(57):769-774
5. Adams R. J., Mckie V. C., Brambilla D. J., et al. -"Stroke prevention trial in sickle cell disease of the brain", *Pediatr Radiol.* 2005;35(3):249-257
6. Adams R. J., Mckie V. C., Carl E. M., et al. -"Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler". *Ann Neurol*, 1997;42(5):699-704
7. Adams R. J., Mckie V. C., Nichols F. T., et al. -"The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle-cell disease", *N. Engl J Med.* 1992; 326 (9) 650
8. Adams RJ, Brambilla D. Discontinuing Prophylactic Transfusions Used to prevent Stroke in Sickle Cell Disease.(STOP2) *N ENGL J MED* 353;26 December29, 2005
9. Aliyu ZY, et. al. Prevalence and risk factors for pulmonary artery systolic hypertension among sickle cell disease patients in Nigeria. *Am Haematol* 2008;83(6):485-90
10. Armstrong FD, et al. Cognitive functioning and brain magnetic resonance imaging in children with sickle cell disease. Neuropsychology Committee of the Cooperative Study of Sickle Cell disease. *Pediatrics.*1996;97 :864-870
11. Angelini C., Battistin L., *Neurologia Clinica*
12. Ayi K, Turrini F, Piga A, et al. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 2004;104:3364-71
13. Ballas SK, Dover GJ, Charache S. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *Am J Hematol.* 1989;32:104-11
14. Baumgartner RW, et. al. Transcranial color-coded duplex sonography *J Neurol* 1999; 246:637-647

15. Bernaudin F., et. al. Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: Radiographic and psychometric correlation. *Journal of Child Psychology* 2000;15:333-343
16. Bocquillon P, et. al. Use of swLORETA to localize the cortical sources of target- and distracter-elicited P300 component *Clinical Neurophysiology* 2011; doi:10.1016/j.clinph2011.03.014
17. Bolanos-Meade J, Brodsky RA. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: overcoming barriers to success. *Curr Opin Oncol.*2009:CD007001
18. Brown RT., et al. Neurocognitive functioning and magnetic resonance imaging in children with sickle cell disease. *Journal of Pediatric Psychology*, 2000;25:503-513
19. Buchanan GR, DeBaun M. et al Sickle Cell Disease. *Hematology*,2004; 35-47
20. Bulas DL, et. al. Transcranial Doppler (TCD) screening for stroke prevention in sickle cell anemia : pitfalls in technique variation. *Pediatr. Radiol* 2000;30:733-738
21. Charache S, Barton FB, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MH, Dover GH, Ballas SK, McMahon RP, Castro O, Orringer EP, Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive “switching” agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine.* 1996;75:300-26
22. Cohen MJ. et al. ,Neuropsychological impairment in children with sickle cell anemia and cerebrovascular accidents. *Clinical Pediatrics*,1994;33:517-524
23. Colombatti R, Visonà dalla Pozza L, Mazzucato M, Sainati L, Pierobon M, Facchin P. Hospitalization of children with sickle cell disease in a region rates with increasing immigration. *Haematologica* 2008 Mar;93(3)463-4
24. Craft S, et al. Neuropsychologic effects of stroke in children with sickle cell anemia. *Journal of Pediatrics*, 1993;123:712-717
25. Daniel Y. Haemoglobinopathy diagnostic tests: blood counts, sickle solubility test, haemoglobin electrophoresis and high-performance liquid chromatography, in *Practical Management of Haemoglobinopathies* I.Okpala, Blackwell Publishing 2004
26. Dawson GD. A summation technique for the detection of small evoked potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 1954;6(1):65:84

27. Dobson SR, Kenton R. et al. Moyamoya syndrome in childhood sickle cell disease: a predictive factor for recurrent cerebrovascular events. *Blood*.1 may 2002;99(9):3144-3150
28. Doppler CA.Über das farbige licht der Doppelsterne und einiger ander Gestirne des Himmels. *Abhandl Böhm Ges Wiss Prag*,1842
29. Driscoll MC et. al.Stroke risk in siblings with sickle cell anemia.*Blood* 2003;101:2401-2404
30. Gastoldi G., Liso V.: *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. Ed. McGraw Hill 2001, 3:92
31. Gaston MH, Rosse WF. The cooperative study of sickle cell anemia. *BJ Hemat* 2005, 129:465481
32. Gaston MH, Rosse WF. The cooperative study of sickle cell disease Review of study design and objectives. *Am J Pediatric Hematol/Oncol* 1982;4:197-201
33. Gladwin MT, Sachdev V, Jison MI, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patient with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004;350:886-95
34. Gooding DS Age-related variations in evoked potentials to auditory stimuli in normal subject. *Electroencephalogr.Clin.Neuriphsiol*.1978;44(4):447-581
35. Gosalakkal JA. Moyamoya Disease: A Review *Neurol India*,2002;50:6-10
36. Gulbis B, Haberman D, Dufour D, Chritophe C, Vermylen C, Kagambega F, Corazza F, Devalck C, Dresse MF, Hunninck K, Klein A, Le PQ, Loop M, Maes P, Philippet P, Sariban E, Van Geet C, Ferster A. Hydroxyurea for sickle cell disease in children and for prevention of cerebrovascular evets: the Belgian experience. *Blood*.2005;105:2685-90
37. Hahn EV, Gillespie EB:”Sickle cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy – *Arch Iner Med* 1927; 39:233
38. Haldane JBS. The rate of mutation of human genes. *Hereditas* 1949;35:267-73
39. Hansen JC, Hillyard SA. Temporal dynamic of human auditory selective attention. *Psychophysiology* 1988;25:316-329
40. Herrick J.B. Peculiar elongated and sickle –shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch.Inter.Med* 1910; 6:517-521

41. Hogan AM, et al. An exploratory study of physiological correlates of neurodevelopmental delay in infants with sickle cell anaemia. *Br J Haem*,2005;132:99-107
42. Houkin K, et al. Novel Magnetic Resonance Angiography Stage Grading for Moyamoya Disease *Cerebrovasc Disease* 2005;20:347-354
43. Houkin K, et al. Novel Magnetic Resonance Angiography Stage Grading for Moyamoya Disease *Cerebrovasc Disease* 2005;20:347-354
44. Jones AM, Seibert JJ, Nichols FT, Kinder DL, Cox K, Luden J, Carl EM, Brambilla D, Saccente S, Adams RJ – Comparison of transcranial color Doppler imaging (TCDI) and transcranial Doppler (TCD) in children with sickle-cell anemia, *Pediatr Radiol*, 2001;31:461-469
45. Josephson CD, Su LL, Hillyer KL, Hillyer CD. Transfusion in patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfus Med Rev* 2007;21:118-33
46. Kato GJ, Heppel RP et al. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, Pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. *American J. of Haematology*. 2009
47. Kirk GR, et al. Regionally Specific Cortical Thinning in Children with Sickle Cell Disease *Cerebral Cortex* 2009; 19:1549-1556
48. Krejza J, Mariak Z, Babighian VL – Importance of angle correction in the measurement of blood flow velocity with transcranial Doppler sonography. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22:1743-47
49. Krejza J, Rudzinski W, Pawlak MA, Tomaszewski M et al. Angle-Corrected Imaging Transcranial Doppler Sonography versus Imaging and Nonimaging Transcranial Doppler Sonography in Children with Sickle Cell Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:1613-18
50. Krejza J. et al – Sickle Cell Disease and Stroke. L.S. Medina et al.(eds.)*Evidence-Based Imaging in Pediatrics*.2010:53-68
51. Kutas at al. Augmenting mental chronometry: the P300 as a measure of stimulus evaluation time. *Science* 1977;197:792-795
52. Kwiarkowski JL, Zimmerman RA. Et al Silent infarcts in young children with sickle cell disease *BJH*, 2009;146:300-305
53. Kwiatkowski J., Granger S, Brambilla DJ, et al.- Elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery and stroke risk in sickle cell disease: extended analysis from the STOP trial. *British Journal of Haematology* 2006;134:333-339

54. Lee MT, Piomelli S, Granger S et al. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP): extended follow-up and final results *Blood* 2006;108n.3
55. Leiken SL, Gallagher D, Kinney TR, et al. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics* 1989;84:500-8
56. McMarville MB, Li C, Xiong X, Wang W – Comparison of Transcranial Doppler Sonography With and Without Imaging in the Evaluation of Children With Sickle Cell Anemia. *AJR* 2004;183:1117-1122
57. Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr.* 2001, 139: 385-390
58. Miller ST, Sleeper LA et al. Prediction of adverse outcome in children with sickle cell disease. *New Englan J of Med.*2000;342(21):1612:1613
59. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of aemoglobin disorders and derived service indicators. *Bollettin of The World Health Organization* 2008;86:480-7
60. Nagel RL,Ranney HM, Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. *Semin Hematol* 1990;27:342-59
61. Neel JV. The inheritance of sickle cell anemia. *Science* 1949;110:64-6
62. Neish AS, Blews DE, Simms CA et al. Screening for Stroke in Sickle Cell Anemia: Comparison of Transcranial Doppler Imaging and Nonimaging US Techniques. *Radiology* 2002;222(3):709-714
63. Odièvre MH, Verger E, Silva-Pinto AC & Elion J Pathophysiological insights in sickle cell disease Review Article *Indian J Med Res* 134 October 2011:532-537
64. Ohene-Frempong K Stroke in sickle cell disease: Dmographic, clinical, and therapeutic consideration.*Semin Hematol.*;1991,28:213-219
65. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM. Cerbrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.*1998;91:288-294.
66. Oken BS, Kaye JA. Electrophysiology function in the healthy extremely old. *Neurology* 1992;42:519-526
67. Padayachee ST, et al. Problems with implementing a standardized transcranial Doppler screening programme: impact of instrumentation variation on STOP classification *Pediatr Radiol* 2011 DOI 10.1007/s00247-011-2263-4

68. Paleari R. et al. Anemia a cellule falciformi e sindromi correlate:aggiornamenti e prospettive. *Biochimica Clinica* vol.34 2010;(4):250-258
69. Pascual-Marqui R.D, C.M. Michel. Loreta (low resolution brain electromagnetic tomography): new authentic 3D functional images of the brain. *ISBET Newsl.* ISSN 5, 4-8.
70. Pass KA, Lane PA, Fenhoff PM et al. U.S.newborn screening system guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN). *J Pediatr* 2000 (4Suppl):S1-46
71. Pauling L,Itano HA, Singer SJ, et al: Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110:543-8
72. Pegelow CH, et al. Silent infarcts in children with sickle cell anemia and abnormal cerebral artery. *Arch. Neurol* 2001; (56):2017-2022
73. Powars DR Hiti A. Sickle Cell Anemia: beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993;147:1197-202
74. Powars DR, Chan L, Schroeder WA. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implication. *Am J Ped Hematol/Oncol* 1990;12:367-74
75. Raphael JL et al. A critical assessment of Transcranial Doppler screening rates in a large Pediatric Sickle Cell Center: Opportunies to improve Healthcare Quality. *Pediatr Blood Cancer*, 2008;51:647-651
76. Roberts I, De Montalembert M.Sickle Cell Disease as a paradigm of immigration hematology: a new challenges for a hematologists in Europe. *The Hematology Journal* 2007;92(07) 865
77. Russo-Mancuso G, La Spina M, Schilirò G. The changing profile of SCD in Italy. *Eur J Epidemiol* 2003;18:923-4
78. Russo-Mancuso G, Romeo MA, Guardabasso V, Schilirò G, Survey of sickle cell disease in Italy. *Haematologica* 1998;83:875-881
79. Sarnaik SA & Luser JM Neurological complication of sickle cell anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1982;4(4):386-94
80. Schaltz J et al. Lesion burden and cognitive morbidity in children with sickle cell disease. *J Child Neurol.* 2002;17(12):891-895
81. Schatz J, et al. Neuropsychologic deficits in children with sickle cell disease and cerebral infarction: role of lesion site and volume. *Child Neuropsychology*,1999;5:92-103

82. Shaw P, et al. Intellectual ability and Cortical development in children and adolescent. *Nature*, 2006;440:676-679
83. Silvestroni E., Bianco I. Una nuova entità nosologica: “La malattia micro-drepanocitica”. *Haematologica* 1946;29:455-8
84. Smith JL Understanding and treating Moyamoya disease in children. *Neurosurg Focus* 2009;26:E4
85. Sowell ER, et al. Longitunal Mapping of Cortical Thikness and Brain Growth in Normal Children. *The Journal of Neuroscience*, 2004;24(38):8223-8231
86. Steinberg MH, Predicting clinical severity in sickle cell anemia. *BJ Hematol* 2005, 129:464-481
87. Sutton S. et al. Evoked- Potential correlates of stimulus uncertainty. *Science*,1965;150(3700):1187-1188
88. Swerdlow PS, Platt OS, Atweh GF. Red cell exchange in sickle cell disease. *Haematology Am Soc Hematolo Educ Program* 2006:48-53
89. Sydenstricker V.P., Mulheerin W.A., Houseal R.W.: Sickle Cell Anemia: report of two cases in children, with necropsy in one case. *Am J Dis Child* 1923; 26:132
90. Talairach, J. & Tournoux, P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human *Brain*. Thieme Medical, New York, 1988
91. Triantafyllou NI, et. al. Cognition in homozygous beta-thalassemia disease: a multichannel auditory event-related potential (P300) study *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*,1992;32:531-536
92. United Nations - General Assembly GA/10803 – ADOPTING CONSENSUS TEXT, GENERAL ASSEMBLY URGES MEMBER STATES, UNITED NATIONS
93. VI Congresso della Società italiana talassemie ed emoglobinopatie – Firenze 2011-12-26
94. Vichinsky EP: Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality. *Semin Hematol/oncol* 1982;4:197-201
95. Volpe U, et. al. The cortical generators of P3a and P3b: A LORETA study *Brain Research Bulletin* 2007;73:220-230
96. Wagner MC, Ekman JR et al Sickle Cell adhesion molecules dependes on hemodynamics and endothelial activation *J Lab Cli Med* 2004;(144):260-7

97. Wang WC, Pavlakis SG. et al. MRI abnormalities of the brain in one-year-old children with sickle cell anemia *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Nov;51(5):643-6
98. Watkins KE, et al. Cognitive deficits associated with frontal-lobe infarction in children with sickle cell disease. *Developmental Medicine & Child Neurology*,1998;40:536-543
99. Watson J,Stahman AW et al. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. *Am J Med Sci* 1948; 215:419:23
100. Wechsler D. Wechsler Intelligence Scale for Children – Third Edition. *Psychological Corporation* 1991
101. Zimmeman SA, Schultx WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE. Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood*.2007;110:1043-7
102. Zimmerman RA.MRI/MRA evaluation of sickle cell disease of the brain. *Pediatr. Radiol*.2005;35:2249-257