

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Corso di laurea magistrale in Bioingegneria

**Valutazione di misure spettrali di ampiezza e fase per la
stima della risposta neurale dal segnale EEG in un
paradigma frequency tagging nel limite di basse
frequenze e brevi periodi di registrazione**

Evaluation of spectral amplitude and phase measurements for the estimation of the neural response from the EEG signal in a frequency tagging paradigm in the limit of low frequencies and short recording periods

Relatore:

Prof.ssa Alessandra Bertoldo

Co-relatori:

Dott. Marco Buiatti,

Prof. Giorgio Vallortigara

Candidato: Davide Saretta

11 Luglio 2022

Anno Accademico 2021/2022

ABSTRACT

L'elettroencefalografia (EEG) è una tecnica non invasiva utilizzata per la registrazione dell'attività cerebrale, particolarmente adatta per lo studio delle funzioni neurali di una vasta gamma di popolazioni, inclusi bambini e neonati. Per studiare le risposte neurali associate ad uno stimolo, negli ultimi anni si è sempre più diffuso il paradigma "frequency-tagging", che si basa sulla capacità del cervello di rispondere a stimoli visivi e uditivi presentati periodicamente ad una specifica frequenza temporale (i.e., frequenza di "tag") con una forte risonanza (spesso indicata come "steady-state response") alla medesima frequenza durante il periodo di stimolazione. Poiché la misura della steady-state response ha un alto rapporto SNR, questo paradigma sperimentale è particolarmente adatto per l'identificazione delle risposte neurali nei neonati, i quali hanno una capacità di attenzione molto limitata. Studi recenti hanno mostrato che è possibile investigare le basi neurali di alcune funzioni cognitive dei neonati come il linguaggio o la rappresentazione dei volti con paradigmi di frequency-tagging, ma a frequenze di stimolazione molto basse, intorno a 1 Hz. Questo approccio porta ad un problema metodologico rilevante: è necessario trovare il metodo più efficace per ottenere una stima affidabile della risposta neurale con periodi di registrazione molto brevi e frequenze di stimolazione molto basse. Per rispondere a questa domanda, in questo lavoro di tesi abbiamo sfruttato un dataset EEG registrato con il paradigma frequency tagging in soggetti adulti attraverso una stimolazione visiva sinusoidale a due diverse frequenze: 0.8 Hz (bassa frequenza adatta a studi neurocognitivi sui neonati) e 4 Hz (frequenza per la quale la risposta "steady-state" visiva è tipicamente robusta), per investigare quale misura della steady-state response fosse più affidabile al diminuire della lunghezza del segnale

EEG. Le misure testate sono quelle più comunemente utilizzate negli studi con paradigmi frequency-tagging: misure basate sull'ampiezza della risposta (Power Spectrum (PS) ed Evoked Power Spectrum (EPS)) e sulla coerenza di fase della risposta (Inter Trial Phase Coherence (ITC) e Pairwise Phase Consistency (PPC)).

Come previsto, i risultati hanno dimostrato che la risposta neurale è più forte per la stimolazione a 4 Hz rispetto alla stimolazione a 0.8 Hz, e che la risposta alla frequenza di stimolazione a 4 Hz sia robusta sia con le misure di ampiezza che con quelle di fase anche per segmenti molti brevi di segnale (1 s). Per la frequenza di stimolazione a 0.8 Hz invece, mentre per segmenti relativamente lunghi (dai 20 s in su) l'ITC risulta la misura più affidabile, nel limite dei segmenti corti (10 s) solo il Power Spectrum mostra effetti significativi, mentre le misure basate sulla coerenza di fase (ITC, PPC) e l'Evoked Power Spectrum non risultano più affidabili. Questo risultato fornisce un riferimento metodologico importante per gli studi basati su frequency-tagging su popolazioni delicate come neonati, bambini piccoli e in contesti clinici.

Indice

1 INTRODUZIONE.....	9
1.1 L'elettroencefalografia.....	9
1.1.1 Cenni neurofisiologici.....	10
1.1.2 Origine del segnale EEG.....	12
1.1.3 Misurazione del segnale ed elettrodi.....	15
1.2 Frequency Tagging.....	17
1.2.1 Vantaggi.....	18
1.2.2 Evoluzione ed utilizzo del paradigma sperimentale.....	19
1.3 Obiettivo.....	23
2. INTRODUZIONE TEORICA ALLE METODOLOGIE UTILIZZATE PER L'ANALISI DEL SEGNALE EEG.....	26
2.1 Dal dominio del tempo al dominio della frequenza.....	26
2.2 Valutazione della risposta neurale.....	28
2.2.1 Power Spectrum.....	29
2.2.1.1 Evoked Power Spectrum.....	30
2.2.1.2 Stima del rumore spettrale di fondo.....	31
2.2.2 Inter Trial Phase Coherence e Pairwise Phase Consistency.....	32
3. MATERIALI E METODI.....	38
3.1 Stimoli e setup per l'acquisizione dei dati EEG.....	38
3.2 Pre-processing.....	39
3.3 Frequency tagging.....	43
3.3.1 Power Spectrum.....	43
3.3.2 Evoked power spectrum.....	44
3.3.3 Inter trial phase coherence e pairwise phase consistency.....	45
3.4 Analisi statistica.....	45
3.4.1 Ground truth.....	46
3.4.2 Wilcoxon Signed Rank Test.....	47

4. RISULTATI	49
4.1 Attivazione nel caso del ground truth	50
4.1.1 Risonanza a 0.8 Hz.....	50
4.1.2 Risonanza a 4 Hz.....	54
4.2 Stima della risposta neurale al diminuire della lunghezza di segnale	55
4.2.1 Risonanza a 0.8 Hz.....	55
4.2.2 Risonanza a 4 Hz.....	59
4.3 Analisi supplementare della coerenza di fase con la Pairwise Phase Consistency	59
5. DISCUSSIONE.....	64
6. CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69

1 INTRODUZIONE

1.1 L'elettroencefalografia

Il cervello è l'organo del corpo umano che gestisce le principali funzioni vitali. Numerosi studi hanno dimostrato, nel corso degli anni, come alla base dell'attività cerebrale ci siano impulsi elettrici generati dall'interazione dei neuroni. Fu il medico Hans Berger, nel 1924, il primo a registrare l'attività elettrica del cervello umano durante un'operazione chirurgica ad un paziente. Egli utilizzò aghi di acciaio bagnati di zinco e inseriti nel tessuto sottocutaneo dello scalpo. Nei suoi studi notò che le varie forme d'onda dei segnali registrati differivano sia per la posizione di registrazione sullo scalpo, sia tra soggetti sani e patologici. Notevole influenza aveva anche la condizione in cui si trovava il soggetto durante la registrazione: attenzione, rilassamento, oppure sonno. L'esperimento di Berger gettò le basi dell'elettroencefalografia (EEG).

L'elettroencefalografia è la registrazione dell'attività elettrica cerebrale attraverso dei sensori posizionati sul cuoio capelluto con lo scopo di fornire una grande quantità di informazioni relative all'attività cerebrale in corso in una scala di millisecondi (Jackson & Bolger, 2014; Nunez et al., 2006). Inoltre, risulta essere una delle tecniche di diagnostica e di screening più consolidate ed utilizzate poiché registra direttamente il campo elettrico generato dall'attività neurale (Niedermeyer & da Silva, 2005). La sua efficacia, la possibile portabilità, la non invasività e il basso costo rendono l'EEG una delle tecniche più utilizzate per lo studio delle funzioni e delle patologie cerebrali, sia in ambito clinico che di ricerca scientifica (Subha et al., 2010; Thompson et al., 2008). È possibile porre l'attenzione sull'attività che il cervello svolge in maniera costante

indipendentemente da ciò che sta facendo il soggetto oppure rilevare la risposta cognitiva ad un particolare evento o stimolazione a cui esso viene sottoposto.

1.1.1 Cenni neurofisiologici

Il sistema nervoso centrale (SNC) è costituito da un insieme di organi e tessuti specializzati la cui funzione principale è quella di ricevere e riconoscere stimoli provenienti dall'ambiente esterno o interno per poi elaborare una risposta specifica e adeguata. Il SNC è costituito dall'encefalo, contenuto nella cavità cranica, e dal midollo spinale, situato all'interno del canale vertebrale.

La corteccia cerebrale è la struttura più evoluta e complessa del sistema nervoso centrale. È formata da diverse regioni che svolgono ruoli fondamentali per l'essere umano come la capacità percettiva, motoria e sensoriale. È responsabile, inoltre, delle funzioni nervose quali apprendimento, memoria, linguaggio e coscienza. La corteccia è suddivisa in quattro lobi, ognuno dei quali svolge una funzione specifica: lobo frontale, lobo temporale, lobo parietale e lobo occipitale (Fig.1.1). Il lobo frontale è composto dalle aree funzionali preposte al movimento, alla capacità linguistica e all'elaborazione del pensiero. Il lobo temporale ha a che fare con la percezione uditiva e olfattiva, con l'apprendimento e con la memoria. Il lobo parietale è sede della percezione somatosensoriale e della percezione gustativa. Il lobo occipitale racchiude invece le aree funzionali per l'elaborazione delle funzioni visive.

La corteccia cerebrale è composta in media da cento miliardi di cellule nervose: i neuroni corticali. Essi sono un particolare tipo di cellula eccitabile in grado di ricevere, elaborare e trasmettere informazioni alle cellule adiacenti attraverso impulsi elettrici che prendono il nome di potenziali d'azione (Bear et al., 2007).

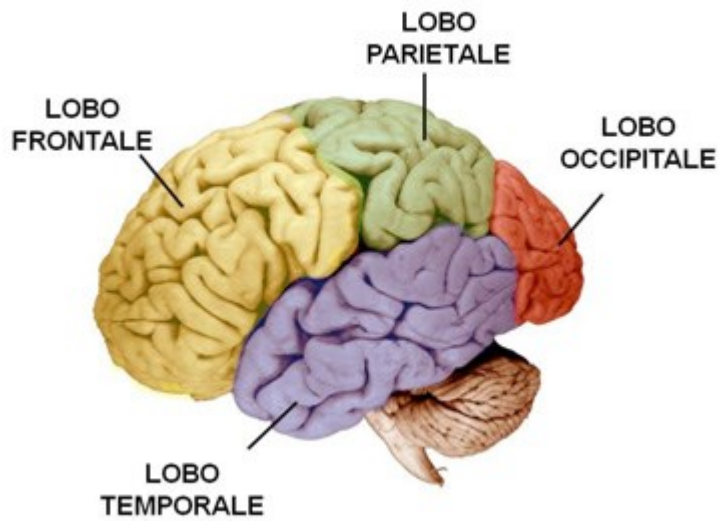


Figura 1.1 – Suddivisione in lobi della corteccia cerebrale

I neuroni sono composti da un corpo centrale, detto soma, dal quale si diramano due prolungamenti citoplasmatici, i dendriti e l'assone (Fig.1.2). I dendriti sono delle spesse e corte ramificazioni che si sviluppano vicino al soma e hanno la funzione di trasmettere al corpo centrale le informazioni contenute all'interno degli impulsi elettrici provenienti dall'esterno o da altri neuroni. L'assone invece, è un lungo filamento, unico per ogni neurone, che trasmette gli impulsi nervosi ad altri neuroni o tessuti, come ad esempio i muscoli. I punti di giunzione, attraverso i quali i neuroni sono in grado di scambiare informazioni sottoforma di impulsi elettrici, vengono chiamati sinapsi. I neuroni sono fortemente interconnessi tra di loro e si organizzano in reti neurali tramite le sinapsi, di cui si stima ve ne siano circa $5 * 10^{14}$ all'interno di un unico individuo (Wolpaw 2004).

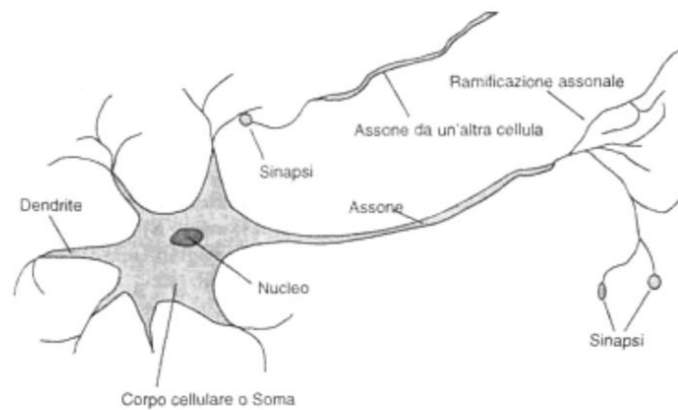


Figura 1.2 - Struttura del neurone

1.1.2 Origine del segnale EEG

I neuroni, a seconda della loro forma, possono essere classificati in tre diverse tipologie: cellule piramidali, cellule stellate e cellule fusiformi. Sono i neuroni piramidali a costituire una parte preponderante della corteccia cerebrale e a giocare un ruolo fondamentale nella generazione del segnale EEG. Essi presentano un corpo centrale, o soma, a forma conica, dendriti basali e un dendrite apicale che si sviluppa verso la superficie della corteccia cerebrale e un assone proiettato verso la materia bianca del cervello. Dendrite apicale e assone presentano molte ramificazioni che rendono possibile lo scambio di informazioni tra neuroni. Caratteristica fondamentale di queste cellule piramidale è l'orientazione perpendicolare alla corteccia cerebrale dei loro dendriti. La fonte primaria del segnale elettroencefalografico deriva dall'attività sinaptica sincronizzata in popolazioni di neuroni corticali (i.e., le cellule piramidali) (Holmes & Khazipov, 2007).

L'attività elettrica cerebrale si può distinguere in due fasi: il potenziale d'azione e il potenziale post-sinaptico. Il potenziale d'azione è un fenomeno che si manifesta nei neuroni e che prevede un rapido cambiamento di carica tra l'interno e l'esterno della loro membrana cellulare. Si tratta di picchi di voltaggio di durata molto breve, circa 1 o 2 ms, che viaggiano lungo l'assone. Maggiore è la quantità di questi picchi nell'unità di tempo, più forte risulta il potenziale d'azione. L'unico modo per riuscire a registrare questo tipo di segnale è quello di misurare l'attività di più neuroni contemporaneamente. È necessario però che i potenziali si manifestino tutti allo stesso istante e in modo parallelo per evitare che si annullino tra di loro generando così un segnale più debole rispetto a quello reale. Ciò risulta davvero complicato in un'ipotetica situazione reale. Motivo per il quale il potenziale d'azione è misurabile solamente a diretto contatto con il sito di interesse e quindi in un essere vivente solamente attraverso un'operazione chirurgica.

Il potenziale post-sinaptico invece, si manifesta subito dopo il potenziale d'azione e ha una durata molto più lunga, dell'ordine di decine, centinaia di millisecondi, essendo così più facilmente registrabile. Esso non è altro che il potenziale d'azione che viene trasmesso attraverso una sinapsi al neurone che lo riceve. I neuroni creano una tensione extracellulare, in prossimità dei dendriti, più negativa che altrove lungo il neurone. Questa situazione viene definita dipolo elettrico, cioè una coppia di cariche, una positiva e una negativa, separate da una certa distanza. Gli elettrodi posizionati sullo scalpo rilevano la somma delle cariche positive e negative nelle loro vicinanze. Nel caso in cui l'elettrodo sia equidistante dalle due estremità del dipolo, allora la misura risulta essere neutra. Per rilevare la carica l'elettrodo deve essere più vicino all'estremità positiva o negativa. Proprio per questo è possibile misurare due tipi di dipoli attraverso l'EEG: dipoli tangenziali, i quali sono orientati parallelamente alla superficie, e dipoli radiali, i quali

sono orientati perpendicolarmente alla superficie del cuoio capelluto (Ahlfors et al., 2010; Whittingstall et al., 2003). Il dipolo generato da un singolo neurone risulta essere troppo piccolo per essere misurato dallo scalpo. Tuttavia, poiché gli elettrodi rilevano tutte le cariche nelle loro vicinanze, i dipoli di più neuroni si sommeranno assieme generando così un potenziale molto più forte che riesce ad essere colto dagli elettrodi quasi istantaneamente. La grandezza del dipolo rilevato rispecchia il numero di neuroni i cui dipoli vengono sommati (Jackson & Bolger, 2014). Condizione necessaria affinché venga misurato il segnale EEG è che i neuroni siano tutti disposti parallelamente tra di loro. La disposizione parallela è necessaria per avere un dipolo misurabile perché se i neuroni sono tutti disposti con lo stesso orientamento i loro segnali si sommano a formare un segnale più grande (Fig.1.3a). Invece, nel caso in cui i neuroni formano tra di loro un angolo di 90 gradi si otterrebbe un annullamento parziale della carica fino ad arrivare ad un annullamento totale per angoli di 180 gradi (Fig.1.3b)

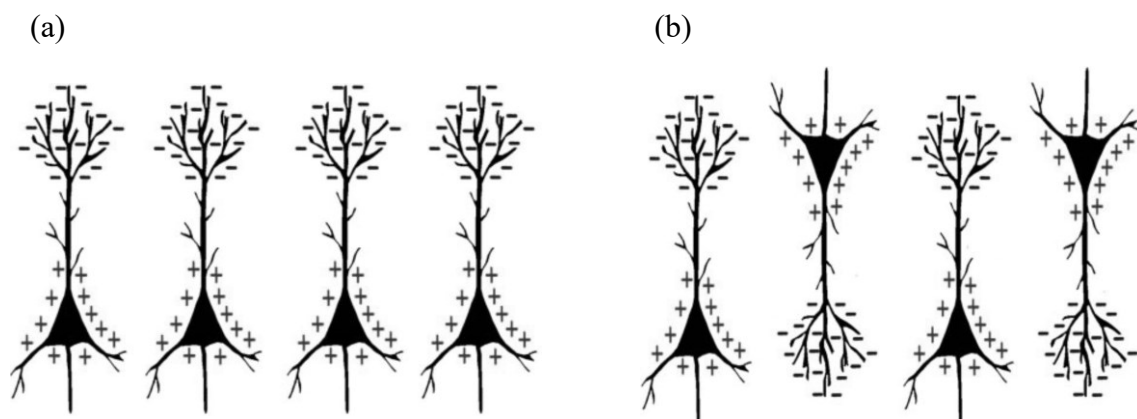


Figura 1.3 – Immagine rappresentativa della disposizione parallela dei neuroni per la misurazione del segnale. a) stesso orientamento, i segnali negativi si sommano per essere misurabili a livello dello scalpo. b) i neuroni formano un angolo di 180 gradi. I segnali negativi e positivi si elidono a vicenda e non sono così misurabili a livello dello scalpo.

1.1.3 Misurazione del segnale ed elettrodi

Come descritto in precedenza, il segnale propagato dai neuroni giunge in superficie sullo scalpo e viene misurato come differenza di potenziale. Il sistema EEG è quindi in grado di rilevare e registrare questo segnale analogico, trasformarlo in un segnale digitale equivalente che sia possibile memorizzare e analizzare. La misurazione del segnale cerebrale avviene per mezzo degli elettrodi, solitamente sotto forma di dischi metallici che, con l'aiuto di un particolare gel conduttivo necessario a connettere la pelle con l'elettrodo, riescono a rilevare la parte più superficiale dell'attività elettrica della corteccia cerebrale. Il numero degli elettrodi posizionati sullo scalpo varia da 32, 64, 128 fino ad arrivare a casi di altissima densità con 256 elettrodi. È bene notare che più elevato è il numero di elettrodi utilizzati più facile risulta ottenere una maggiore specificità spaziale della misura, molto utile in alcune tipologie di studio. Allo stesso tempo però, questo fattore può portare alla formazione di ponti elettrici tra elettrodi vicini attraverso il gel conduttore.

Poiché il segnale rilevato dagli elettrodi è a tutti gli effetti una differenza di potenziale, è facile notare come esso non dipenda da un singolo punto, cioè un neurone o un insieme di neuroni, bensì da due punti. Proprio per questo motivo, per misurare il segnale in un certo punto di interesse è necessario posizionare un elettrodo nel medesimo punto e un secondo elettrodo, ad una certa distanza dal primo, che possa essere preso come riferimento. L'ideale sarebbe scegliere come punto per l'elettrodo di riferimento una posizione elettricamente neutra. Ciò è impossibile; nella realtà quindi ci si limita a scegliere dei siti che più si avvicinano alla neutralità. Quando si ha la possibilità di posizionare elettrodi in tutta, o quasi, la superficie della testa si può scegliere di utilizzare come riferimento il voltaggio medio di tutti gli elettrodi.

Per rendere le misurazioni dell'EEG confrontabili tra di loro è stato definito uno schema standard per il posizionamento degli elettrodi che prende il nome di *Sistema Internazionale 10-20* (Klem, 1999). Esso stabilisce la distanza tra due elettrodi adiacenti come percentuale della distanza totale tra fronte-retro e destra-sinistra del cranio. Queste percentuali sono del 10 e 20 per cento. Secondo questo standard gli elettrodi sono contrassegnati attraverso una lettera ed un numero (Fig.1.4). La lettera maiuscola sta a identificare il lobo o l'area dalla quale l'elettrodo in considerazione sta acquisendo il segnale. Le lettere F, T, C, P, O indicano rispettivamente il lobo frontale, temporale, centrale, parietale e occipitale. I numeri dispari sono assegnati alla zona sinistra della corteccia mentre quelli pari alla zona destra. Gli elettrodi posizionati sulla linea mediana sono contrassegnati con l'aggiunta della lettera minuscola z (Seeck et al., 2017).

Come spiegato precedentemente, per la registrazione dell'EEG è necessario utilizzare un elettrodo di riferimento. Generalmente viene sfruttato l'elettrodo Cz oppure una coppia di elettrodi in prossimità dell'orecchio o sopra la mastoide.

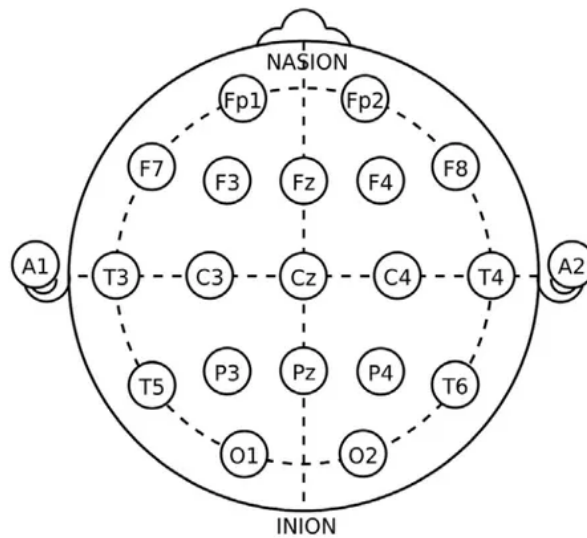


Figura 1.4 – Rappresentazione del Sistema Internazionale 10-20 per il posizionamento degli elettrodi di un sistema EEG.

1.2 Frequency Tagging

Il frequency tagging (*FT*) è un paradigma sperimentale utilizzato nella registrazione del segnale elettroencefalografico che sta prendendo sempre più piede negli studi elettrofisiologici dell'attenzione e della percezione. Il frequency tagging si basa sulla capacità del cervello di rispondere a stimoli visivi e uditivi presentati periodicamente ad una specifica frequenza temporale (i.e. frequenza di “tag”) attraverso una forte risonanza alla medesima frequenza durante il periodo di stimolazione. Il potenziale evocato allo stato stazionario (*Steady-State Evoked Potential*, *ssEP*) misura la risposta neurofisiologica che il nostro cervello apporta ad una sequenza di stimolazione periodica. A seconda del tipo di stimolazione che viene utilizzata è possibile avere una risposta affidabile nel dominio visivo (*Steady-State Visual Evoked Potentials*, *ssVEP*) o nel

dominio uditivo (*Auditory Steady-State Responses, ASSR*). L'attività cerebrale si sincronizza in modo del tutto naturale al ritmo della stimolazione e può essere registrata dallo scalpo. Questo effetto viene manifestato attraverso un picco nel power spectrum del segnale alla specifica frequenza di "tag" (Norcia et al., 2015). Dal momento che l'attività EEG di fondo è a banda larga in frequenza, la risposta alla stimolazione nel dominio della frequenza risulta essere facilmente distinguibile rispetto all'attività non correlata allo stimolo.

1.2.1 Vantaggi

Il frequency tagging è un paradigma sperimentale adatto e utilizzato in una vasta gamma di studi comprendente un'ampia popolazione, a partire dagli adulti fino ad includere bambini e neonati. Ciò non è un fatto di poco conto dal momento che sono davvero pochi gli studi svolti in soggetti di età ridotta. Questo è dovuto ad una serie di complicazioni come, ad esempio, la ridotta quantità di dati a disposizione per l'analisi a causa della naturale scarsa capacità attentiva che i soggetti possono avere data la giovane età.

Questo paradigma presenta diversi vantaggi a favore degli studi su bambini e neonati. Innanzitutto, il frequency tagging va incontro al problema della limitata capacità di attenzione dei bambini e li aiuta a mantenere la concentrazione sugli stimoli consentendo sessioni di registrazione molto brevi con una elevata frequenza di stimolazione. Ciò porta ad avere una quantità decisamente minore di soggetti da dover scartare successivamente alla seduta sperimentale. Inoltre, la tecnica del frequency tagging permette di attuare studi in cui vengono presentati stimoli multipli a diverse frequenze sovrapposte tra di loro o diverse condizioni nello stesso flusso di stimolazione. Questa tecnica consente ai ricercatori di quantificare e studiare in modo del tutto indipendente la risposta ad ogni

stimolo, anche quando vengono presentati contemporaneamente o in posizioni dello schermo sovrapposte (Wang et al., 2007; Zhigalov et al., 2019). Quindi è possibile utilizzare array di stimoli complessi ottenendo una risposta a ciascun elemento modulato ad una frequenza diversa. Infine, il vantaggio principale del ssEP, come accennato in precedenza, è che la risposta cerebrale è ristretta ad una specifica banda di frequenze. Le risposte infatti hanno un elevato rapporto segnale-rumore (SNR) alla frequenza di stimolazione. Questo perché nel dominio della frequenza il rumore, dovuto ad artefatti come battiti di ciglia e movimenti oculari, è solitamente distribuito lungo l'intero spettro andando così ad intaccare debolmente il potenziale evocato allo stato stazionario, caratteristica che permette di considerare il frequency tagging come un metodo molto robusto per gli artefatti. Inoltre, è necessaria una procedura di rimozione molto più leggera rispetto ad altri tipi di segnale come, ad esempio, per i potenziali evento-correlati (*event-related potentials*, ERPs). L'ssEP offre inoltre una risposta mirata ad una specifica frequenza decisa a priori ovvero esattamente alla frequenza di stimolazione e talvolta alle sue armoniche. Dal canto loro gli approcci nel dominio del tempo, come ad esempio gli ERPs, non garantiscono questa oggettività e precisione sulla tempistica degli effetti attesi. Il rapporto segnale/rumore tra l'ERP e l'EEG di background risulta piuttosto basso in quanto l'EEG presenta un'ampiezza di decine di μV contro i singoli μV degli ERPs.

1.2.2 Evoluzione ed utilizzo del paradigma sperimentale

Molti studi sono stati svolti sfruttando il paradigma sperimentale del frequency tagging e ancora oggi vi è una continua evoluzione della tecnica. Il primo ad introdurlo e a farne uso è stato David Regan intorno agli anni 60, proponendolo come metodo complementare alla tradizionale media del segnale nel dominio del tempo, allo scopo di migliorare il

rapporto segnale-rumore dei potenziali evocati visivi ottenuti come risposte. Si trattava di un metodo attraverso il quale Regan mirava a misurare le caratteristiche della risposta ad una visione di colori da parte dell'osservatore sfruttando solamente mezzi elettrofisiologici (Regan, 1965). I primi studi sulle risposte ottenute tramite una stimolazione uditiva sono stati effettuati da diversi gruppi di ricerca (Galambos et al., 1981; Richards & Clark, 1984; Kuwada et al., 1986).

Verso la fine degli anni 80, alcuni ricercatori, prendendo ispirazione dal lavoro di Regan, hanno provato ad implementare dei protocolli più sofisticati per cercare di ottenere delle misure rapide e obiettive della funzione visiva nelle popolazioni pediatriche. Uno di questi è stato lo sweep VEP (*sweep visual evoked potential*), nel quale uno stimolo visivo veniva proiettato su uno schermo ad una frequenza fissa mentre uno dei suoi attributi fisici veniva fatto variare parametricamente in un range di valori di qualche decina di secondi. L'ampiezza del segnale era calcolata in diversi punti durante lo sweep e l'acuità visiva del soggetto veniva stimata come la frequenza spaziale più elevata alla quale era stata registrata una risposta ssEP significativa (Norcia & Tyler, 1985). Con questo studio Norcia e Tyler hanno dimostrato che l'acuità visiva nei bambini raggiunge i livelli degli adulti a circa otto mesi d'età.

Con il passare degli anni, grazie allo sviluppo apportato dalla comunità scientifica, gli studi svolti con l'utilizzo di questo paradigma si sono intensificati sempre di più e sono diventati sempre più promettenti. A partire dagli anni 2000, i ricercatori hanno iniziato ad utilizzare gli ssEPs per studiare le risposte neurali relative a funzioni percettive o cognitive più complesse come, ad esempio, l'attenzione (Kim et al., 2007) e la segmentazione delle parole in un discorso (Buiatti et al., 2009). In quest'ultimo studio, soggetti adulti sono stati sottoposti a stimolazione attraverso il paradigma frequency

tagging con lo scopo di esplorare i meccanismi neurali alla base dei quali vi è l'apprendimento delle parole. Il segnale elettroencefalografico era registrato mentre i soggetti erano sottoposti all'ascolto di una concatenazione di sillabe casuali o parole trisillabiche artificiali con o senza pause ogni tre sillabe. La risposta alle parole è stata settata ad una frequenza pari ad $1/3$ di quella delle sillabe con lo scopo di dissociare la risposta sensoriale uditiva dall'identificazione della parola. Questo studio è un esempio di utilizzo simultaneo di più frequenze di stimolazione all'interno di un paradigma frequency tagging. I risultati hanno dimostrato come le pause facilitino un'estrazione rapida ed efficace delle parole all'interno di un discorso continuo (Buiatti et al., 2009).

Particolare attenzione è stata rivolta anche all'elaborazione di stimoli visivi di alto livello, come possono essere volti oppure oggetti. Farzin e colleghi hanno registrato le risposte neurali di alcuni bambini ad un flusso di immagini che rappresentavano oggetti o volti presentati ad una frequenza fissa. I dati hanno mostrato come le due categorie erano associate a topografie diverse del cuoio capelluto (Farzin et al., 2012). Attraverso un paradigma frequency tagging a doppia frequenza, de Heering e Rossion hanno utilizzato un flusso di stimolazione con immagini che rappresentavano nuovamente oggetti e volti. La frequenza di base del flusso era fissata a 6 Hz con le immagini dei volti che apparivano ogni 5 elementi (ad una frequenza quindi di 1.2 Hz). I risultati hanno mostrato come solo dopo pochi minuti di registrazione, veniva osservata un'attività significativa a questa frequenza sui siti occipito-temporali di destra in bambini di età compresa tra i 4 e i 6 mesi. Ciò rifletteva la risposta alla categorizzazione del viso (de Heering & Rossion, 2015).

L'elaborazione di volti è stata fatta recentemente anche nei neonati con l'obiettivo di capire se il circuito corticale per il riconoscimento dei volti degli adulti fosse già presente alla nascita o se il suo sviluppo avvenga lentamente in funzione dell'esperienza e della

crescita del soggetto. Buiatti e colleghi hanno misurato le risposte EEG in neonati sani di età compresa tra 1 e 4 giorni presentando, attraverso il paradigma del frequency tagging, un flusso di stimoli consistenti in una schematizzazione di facce reali e invertite (Fig.1.5).

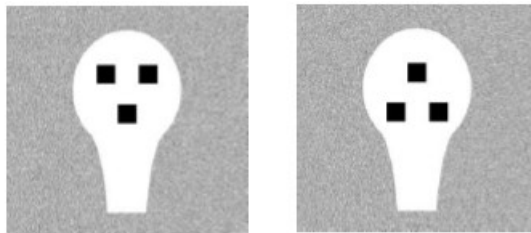


Figura 1.5 – Rappresentazione schematica di facce reali e invertite utilizzate come stimoli nello studio di Buiatti e colleghi (Buiatti et al., 2019).

Gli stimoli venivano presentati periodicamente con una dinamica oscillatoria lenta ad una frequenza di 0.8 Hz. Nonostante la durata dell'attenzione dei neonati fosse molto limitata, è stato comunque possibile stimare delle risposte affidabili per ogni stimolo dal picco dello spettro di potenza dell'EEG alla frequenza di stimolazione. Gli stimoli che schematizzavano un volto reale hanno suscitato nei soggetti una risposta significativamente più forte rispetto a quelli a facce invertite in un ampio set di elettrodi corrispondenti ad una rete corticale parzialmente lateralizzata a destra comprendente aree occipitotemporali laterali e parietali mediali. Ciò ha portato a suggerire che la porzione corticale specializzata nell'elaborazione e nel riconoscimento dei volti negli adulti sia funzionale già alla nascita (Buiatti et al., 2019).

Studi ancor più recenti hanno registrato il segnale elettroencefalografico in bambini di quattro mesi mentre erano sottoposti o meno al loro odore materno. Questo è stato fatto con l'obiettivo di indagare e studiare se e come le funzioni olfattive siano in grado di modellare la visione ad alto livello. I risultati hanno dimostrato come l'odore materno

migliorasse il processo neurale di selezione del volto (Leleu et al., 2020) fino ad arrivare ad innescare nel bambino un'interpretazione di stimoli simili a volti come veri volti (Rekow et al., 2021).

Per analizzare i dati acquisiti attraverso il paradigma sperimentale del frequency tagging sono presenti in letteratura due categorie di misure. La prima, e più utilizzata, è quella che si basa sull'ampiezza delle oscillazioni e comprende misure come power spectrum ed evoked-power spectrum. La seconda invece, sfrutta la fase del segnale andando a valutarne la coerenza nei diversi cicli di stimolazione e comprende misure come inter-trial phase coherence e pairwise-phase consistency.

1.3 Obiettivo

Molti studi sono stati condotti nel campo dell'elettroencefalografia. Di particolare interesse negli ultimi anni è l'analisi dei potenziali evocati di stato stazionario (*steady-state*) attraverso il paradigma sperimentale del frequency tagging. Esso si basa, come spiegato nel paragrafo 1.2, sulla capacità del cervello di rispondere a stimoli visivi e uditivi presentati periodicamente ad una specifica frequenza temporale (i.e., frequenza di "tag") con una forte risonanza alla medesima frequenza durante il periodo di stimolazione.

Sfruttando questo paradigma sperimentale è di nostro interesse andare a studiare le risposte neuro-cognitive in una popolazione di neonati. Questo ci pone di fronte a due principali problematiche. In primo luogo, è necessario utilizzare delle frequenze di stimolazione molto basse compatibili con le risposte cerebrali nei primi giorni di vita. Ciò è di particolare interesse, ad esempio, per studi sulla percezione dei volti (Buiatti et al., 2019) o sull'apprendimento delle parole (Buiatti et al., 2009). Frequenze basse sono

compatibili con i processi cerebrali nei neonati ancora poco sviluppati e quindi fisiologicamente più lenti. Far ascoltare per esempio ad un bambino nei primi giorni di vita parole ad una frequenza elevata non avrebbe alcun senso. In secondo luogo, i neonati hanno capacità di attenzione molto limitata. Ciò comporta l'ulteriore difficoltà di avere a disposizione per l'analisi dei segmenti di segnale molto brevi con pochi cicli di stimolazione. Le frequenze di stimolazione standard, infatti, e più comunemente utilizzate, sono superiori a 6 Hz (Montagna et al., 2017). Pochi sono gli studi che focalizzano la loro attenzione a basse frequenze (0.5-6 Hz) per le quali il rilevamento della risposta è per l'appunto più impegnativo.

Recentemente, grazie ai progressi tecnologici nella progettazione di microprocessori e nella comunicazione wireless, il Centro Interdipartimentale Mente e Cervello (CIMeC) dell'Università di Trento, in collaborazione con l'Università di Bologna, ha sviluppato un prototipo di un Sistema EEG portatile e wireless il cui scopo finale sarà quello di eseguire test neuro-cognitivi su popolazioni di bambini e neonati. Ciò risulta essere di fondamentale importanza perché permetterebbe di studiarne il cervello in qualsiasi momento della giornata senza costringere il paziente a doversi recare in un centro di ricerca o in ospedale per essere monitorato.

Frequenza di stimolazione bassa e segmenti di segnale breve significa avere a disposizione pochi cicli di stimolazione dai quali è necessario estrarre una risposta neurale. Ciò porta ad un problema rilevante: è necessario trovare il metodo più efficace per ottenere una stima affidabile della risposta nelle condizioni critiche sopra citate. È proprio in questo che si focalizza questo lavoro di tesi. Abbiamo sfruttato il frequency tagging, in soggetti adulti, attraverso una stimolazione visiva sinusoidale di tipo “steady-state” a bassa frequenza, 0.8 Hz, per segmenti di segnale sempre minori (25, 20, 15, 10

secondi corrispondenti rispettivamente a 20, 16, 12, 8 cicli di stimolazione). L'obiettivo era quello di analizzare i dati ottenuti e testare, nei soggetti adulti, quattro metodologie avanzate di analisi del segnale come il Power Spectrum (PS), l'Evoked Power Spectrum (EPS), Inter Trial Phase Coherence (ITC) e Pairwise Phase Consistency (PPC) per valutare quale delle quattro fosse più efficace in condizioni di stimolazione a bassa frequenza e lunghezza del segnale molto ridotta. Abbiamo deciso di svolgere questo lavoro su dati acquisiti da soggetti adulti poiché sono dati di durata sufficientemente lunga che ci permettono di avere il "ground truth" che altrimenti non avremmo avuto analizzando direttamente dati di neonati.

Nei capitoli successivi ci sarà in primo luogo un excursus da un punto di vista teorico delle misure che verranno poi utilizzate nelle analisi. Nel terzo capitolo verranno descritti tutti i materiali e i metodi utilizzati per lo studio come il paradigma sperimentale per l'acquisizione del dato EEG, la fase di pre-processing e tutte le metodologie utilizzate per l'analisi del segnale. Successivamente, nel quarto capitolo, verranno riportati tutti i risultati ottenuti e infine, prima della conclusione, seguirà un capitolo di discussione in cui i risultati verranno messi a confronto con i principali studi presenti in letteratura.

2. INTRODUZIONE TEORICA ALLE METODOLOGIE UTILIZZATE PER L'ANALISI DEL SEGNALE EEG

In questo capitolo vengono introdotte, illustrate e spiegate da un punto di vista teorico le misure che sono state utilizzate per l'analisi del segnale una volta ripulito dagli artefatti.

2.1 Dal dominio del tempo al dominio della frequenza

L'elettroencefalografia è una metodologia elettrofisiologica concepita per monitorare e registrare i potenziali elettrici che hanno sede sulla superficie dell'encefalo. Il tracciato elettroencefalografico nasce dal contributo della corrente extracellulare generata dall'attività di un elevato numero di neuroni, i quali generano variazioni elettriche nel tempo dell'ordine dei millisecondi. Il segnale EEG non è altro che la differenza di potenziale elettrico misurata tra un elettrodo attivo, posizionato nel sito del quale si vuole monitorare l'attività, e un elettrodo che funge da riferimento. È possibile rappresentare questo segnale, acquisito nel tempo, nel dominio della frequenza senza alcuna perdita di informazione come un insieme di tensioni oscillanti a varie frequenze. Le quattro misure utilizzate in questo lavoro di tesi rappresentano il segnale proprio nel dominio della frequenza, sfruttandone le caratteristiche dell'ampiezza e della fase.

Il passaggio dal dominio del tempo a quello della frequenza è reso possibile dalla Trasformata di Fourier. Questa tecnica risulta essere lo strumento di elaborazione del segnale più utilizzato nella scienza e nell'ingegneria e deve le sue origini, intorno al primo ventennio dell'800, al matematico francese Joseph Fourier, il quale dimostrò che qualsiasi forma d'onda può essere espressa come la somma di un insieme di onde sinusoidali a specifiche frequenze, ampiezze e fasi. Il teorema di Fourier stabilisce quindi un nesso,

un'equivalenza matematica, tra il dominio del tempo, in cui il segnale $x(t)$ è espresso come una forma d'onda che varia l'ampiezza nel tempo, e il dominio della frequenza, in cui il segnale è rappresentato come uno spettro di ampiezze e fasi che subiscono cambiamenti al variare della frequenza. Essa viene espressa come:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \cdot e^{-j2\pi ft} dt \quad 2.1$$

La FFT (*Fast Fourier Transform*) è un algoritmo efficiente dal punto di vista computazionale per convertire un segnale digitalizzato dal dominio del tempo al dominio della frequenza. Per riuscire a rilevare l'andamento temporale di una sinusoide l'algoritmo ha bisogno di almeno due campioni per ogni ciclo e il limite superiore delle frequenze visualizzabili dipende dalla frequenza di campionamento. La frequenza di campionamento (f_c) descrive in Hertz il numero dei campioni presenti in un secondo di segnale digitale. Lo spettro del segnale trasformato dal dominio del tempo al dominio della frequenza si estende da 0 Hz fino alla metà della frequenza di campionamento utilizzata:

$$f_{max} = f_c/2 \quad 2.2$$

Questa frequenza limite è nota come frequenza di Nyquist.

La risoluzione dello spettro (i.e., differenza tra due bin di frequenza adiacenti) dipende dalla durata del segnale che viene analizzato ed è inversamente proporzionale ad esso corrispondendo al suo reciproco. Volendo fare un esempio, per un'epoca di segnale di 10

secondi campionata con una frequenza di campionamento f_c di 250 Hz, la FFT scompone il segnale in un insieme di frequenze con una risoluzione in frequenza di 0,1 Hz con uno spettro che si estende da 0 Hz fino a 125 Hz. La trasformata di Fourier genera così un insieme di numeri complessi $z_f = a_f e^{j\varphi_f}$, associati ad ogni frequenza f , che prendono il nome di coefficienti di Fourier. Essi contengono le informazioni necessarie per descrivere il segnale nel dominio della frequenza. La fase viene espressa dall'argomento dei coefficienti mentre l'ampiezza dal valore assoluti degli stessi. La fase ad ogni frequenza contiene informazioni di carattere temporale del segnale poiché rappresenta il punto del ciclo dell'onda all'inizio della finestra di analisi. L'ampiezza invece caratterizza la forza di oscillazione dell'onda ad ogni frequenza. Il contenuto in frequenza di un segnale viene solitamente rappresentato attraverso il suo spettro di potenza (i.e., ampiezza elevata al quadrato).

2.2 Valutazione della risposta neurale

In seguito alla trasformazione del segnale dal dominio del tempo al dominio della frequenza, questo viene espresso come un insieme di componenti spettrali, ciascuna caratterizzata dalla propria ampiezza e dalla propria fase.

Gli approcci di elaborazione del segnale nel dominio della frequenza per rilevare una risposta allo stato stazionario possono essere suddivisi in due categorie in base al fatto che si basino sull'utilizzo dell'ampiezza/potenza del segnale oppure della fase. In questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato quattro misure: Power Spectrum ed Evoked Power Spectrum per l'analisi attraverso la potenza del segnale, Inter Trial Phase Coherence e Pairwise Phase Consistency per l'analisi attraverso la fase.

2.2.1 Power Spectrum

Una delle misure più utilizzate per valutare la risposta neurale nel dominio della frequenza è il power spectrum (PS). Esso risulta essere, attraverso il suo approccio diretto, la misura più comune ed intuitiva per l'analisi del segnale. L'energia contenuta in un segnale $x(t)$ è direttamente correlata all'ampiezza del segnale al quadrato integrato nel tempo

$$E = \int_{-\infty}^{+\infty} |x(t)|^2 dt \quad 2.3$$

Grazie ad un'estensione del teorema di Parseval è possibile dimostrare che vale la seguente relazione (Percival & Walden, 1993):

$$\int_{-\infty}^{+\infty} |x(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{+\infty} |X(f)|^2 df \quad 2.4$$

In sostanza, il teorema di Parseval ci fornisce la potenza del segnale a partire dai coefficienti del suo sviluppo in serie di Fourier. Quindi $|X(f)|^2$ è uguale alla funzione densità di energia in frequenza, chiamata anche densità spettrale di energia, densità spettrale di potenza (PSD) o semplicemente spettro di potenza (PS). Nell'approccio diretto quindi, lo spettro di potenza viene calcolato come il modulo quadro della trasformata di Fourier del segnale di interesse:

$$PS(f) = |X(f)|^2 \quad 2.5$$

Questo descrive come la potenza di un segnale è distribuita sulla frequenza.

A differenza della trasformata di Fourier che presenta informazioni riguardanti sia la potenza che la fase del segnale, lo spettro di potenza non contiene informazioni sulla fase, risultando così una trasformazione non invertibile. Ovvero, non è possibile ricostruire il segnale di partenza dallo spettro. Non fornendo informazioni sulla fase, il PS viene utilizzato in situazioni in cui la fase non è considerata di interesse. La forza di ogni componente spettrale corrisponde alla potenza, calcolata come ampiezza al quadrato, del valore complesso corrispondente. Lo spettro del segnale rappresenta la potenza delle componenti ad ogni frequenza. Molte volte lo spettro viene rappresentato sfruttando il logaritmo. Invece di rappresentare la semplice potenza, viene calcolato il logaritmo della potenza spettrale, il quale permette di mitigare la distribuzione della legge potenza inversa del rumore di fondo normalizzando la risposta. I valori della potenza vengono calcolati a ciascuna frequenza per ogni epoca di segnale e mediati successivamente tra tutte le epoche in cui il segnale è stato segmentato al fine di ottenere lo spettro medio (PS).

2.2.1.1 Evoked Power Spectrum

Se si assume che la risposta neurale sia completamente phase-locked rispetto allo stimolo, è possibile calcolare prima la media del segnale tra le epoche e successivamente il valore dello spettro di potenza. Ciò consiste nel calcolare prima l'ERP e poi il PS dell'ERP che prende il nome di *Evoked Power Spectrum* (EPS). Questa metodologia permette di mantenere il segnale attraverso la media ma soprattutto di ridurre l'influenza del rumore di fondo avendo così un SNR maggiore. Questo avviene perché le variazioni di fondo non dipendono dallo stimolo: esse sono sia positive che negative quindi sommandosi tendono

ad elidersi e la componente che rimane è una frazione dell'attività originale. Motivo per il quale questo approccio viene sfruttato ed è particolarmente utile nei casi in cui la registrazione è molto rumorosa.

2.2.1.2 Stima del rumore spettrale di fondo

La potenza spettrale, in un paradigma frequency tagging, viene visualizzata attraverso dei picchi a banda stretta alla frequenza di stimolazione e alle sue armoniche. L'intensità del picco viene quantificata come il rapporto segnale rumore (*signal-to-noise ratio*, *SNR*) tra la potenza registrata alla frequenza di stimolazione e una stima del rumore spettrale di fondo. Maggiore è l'*SNR*, più forte è la risposta allo stato stazionario di interesse.

Il rumore spettrale di fondo può essere stimato in diversi modi. Quello più comune e di semplice intuizione è una media della potenza alle frequenze circostanti la frequenza di stimolazione con la condizione però che queste frequenze non contengano al loro interno armoniche correlate (Regan & Regan, 1989). Un altro metodo per la stima del rumore di fondo è quello utilizzato da Buiatti e colleghi, i quali hanno quantificato le deviazioni locali dello spettro di potenza dalla funzione legge potenza inversa (Buiatti et al., 2019). In questo caso, viene fatto nel power spectrum un fit della legge potenza inversa, e la deviazione ottenuta da questa funzione alla frequenza di interesse viene confrontata con le deviazioni locali calcolate sulle frequenze vicine. Questa misura ha il vantaggio di tenere conto della distribuzione $1/f$ dello spettro di potenza risultando particolarmente utile alle basse frequenze. Infine, il rumore di fondo può essere anche ottenuto con una registrazione durante un periodo di attività privo di stimolazione esterna.

2.2.2 Inter Trial Phase Coherence e Pairwise Phase Consistency

Nelle tradizionali analisi del segnale EEG nel dominio del tempo, la procedura comune prevedeva il calcolo della media dei picchi delle componenti mentre il resto del potenziale evocato veniva scartato. Le analisi tempo-frequenza invece, adottano una prospettiva totalmente diversa. In esse l'attenzione è concentrata nelle oscillazioni cerebrali. Quando l'EEG spontaneo viene perturbato da una stimolazione ad una data frequenza, tale segnale diventa "phase-locked" a quell'evento, ovvero entrambi presentano la stessa fase ad ogni istante (Makeig et al., 2004).

Un altro approccio che può quindi essere utilizzato per quantificare ed analizzare la risposta neurale allo stato stazionario si basa sulle informazioni date dalla fase del segnale e consiste nel quantificare la coerenza di fase, anche chiamata "phase locking". Esso si basa sull'assunzione che la risposta ottenuta attraverso il paradigma del frequency tagging sia perfettamente sincronizzata con la stimolazione ritmica utilizzata ad una data frequenza. Di conseguenza, la fase della risposta neurale alla frequenza di stimolazione sarà per lo più stabile da un ciclo di stimolazione all'altro, rendendo così anche la coerenza di fase elevata. Se invece ci si trova in una condizione per cui l'attività neurale registrata non risulta essere sincronizzata con la stimolazione esterna, allora la fase nei diversi cicli varierà in modo casuale rendendo la coerenza molto bassa. La sincronizzazione di fase costituisce, in generale, una misura che determina quanto un set di oscillazioni siano sincrone tra di loro.

Inizialmente, negli studi relativi all'elettroencefalogramma, il valore di "phase-locking" veniva utilizzato con lo scopo di determinare la sincronizzazione tra due segnali neuro elettrici registrati in elettrodi diversi (Lachaux et al., 1999). Successivamente, è stato stabilito un nuovo approccio sulla coerenza di fase tra i trial di acquisizione (Cohen,

2014). Molteplici sono stati anche gli studi con finalità cliniche che sono stati svolti sfruttando questo tipo di misura (Nash-Kille & Sharma, 2014; Yu et al., 2018; Gyulai et al., 2021).

I calcoli per la coerenza di fase richiedono una valutazione su più epoche di segnale. I dati devono essere quindi segmentati in più epoche, ciascuna allineata all’inizio di un ciclo di stimolazione. È importante sottolineare che per ciascuna frequenza di stimolazione o per ciascuna condizione sperimentale il numero di epoche deve essere lo stesso poiché le stime della coerenza di fase ne sono fortemente influenzate. I metodi che coinvolgono le informazioni sulla fase sono appunto compatibili con quei paradigmi che permettono di avere il segnale “phase-locked” con la stimolazione. Se il segnale neurale segue in maniera consistente la stimolazione, le risposte allo stato stazionario saranno allineate tra le epoche. Ciò porta ad avere una distribuzione delle fasi con poca varianza. È possibile così implementare diverse metodologie di coerenza di fase. La più comunemente utilizzata risulta essere l’inter-trial phase coherence (*ITC*) anche nota come “phase-locking value” (*PLV*) (Tallon-Baudry et al., 1996). Questa misura di fase è espressa dalla formula:

$$ITC(f) = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=1}^N e^{j\varphi_f^n} \right| \quad 2.6$$

Dove N è il numero di epoche in cui è stato segmentato il segnale, φ_f^n è la fase calcolata alla frequenza f per l’epoca n e j è l’unità immaginaria. Il valore di *ITC* può variare in un range che va da 0 a 1. Se φ_f è costante in tutte le N epoche allora avremo risposte cerebrali completamente allineate e il valore di *ITC* sarà uguale a 1 (i.e., coerenza di fase

massima) (Fig.2.1B). Al contrario, se φ_f è molto variabile tra le epoche del segnale allora avremo delle risposte desincronizzate e il valore di ITC sarà prossimo allo 0 (Fig.2.1A). Nel complesso, è possibile notare come la misura di coerenza di fase implementata con ITC mostri l'interessante vantaggio di essere meno sensibile alla distribuzione della legge potenza inversa del rumore spettrale nelle fasi iniziali di registrazione.

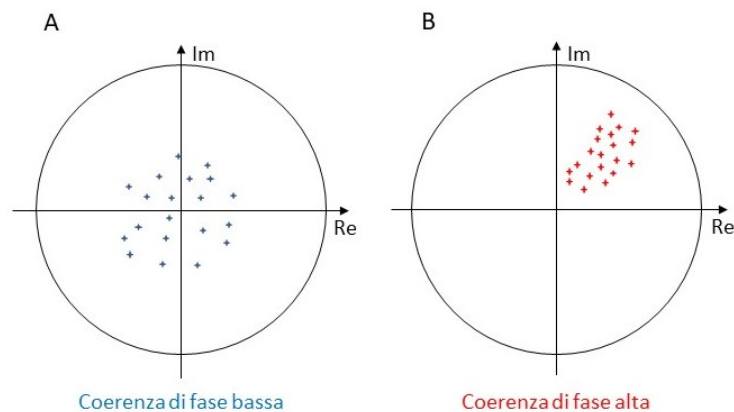


Figura 2.1 – Grafici polari che rappresentano, a titolo di esempio, le distribuzioni di fase alla frequenza di stimolazione (in rosso, coerenza di fase alta) e ad una frequenza non stimolata (in blu, coerenza di fase bassa)

È bene notare che, poiché ITC cattura la varianza della distribuzione delle fasi tra le epoche, è fortemente influenzata dal numero di epoche che vengono considerate. Analisi del segnale con una quantità minore di epoche avranno generalmente un valore di ITC più alto rispetto ad una condizione sperimentale contenente più epoche. È anche vero però che più elevato è il numero di epoche più vettori di fase saranno presenti nella circonferenza unitaria e quindi la media finale che rappresenta ITC sarà sicuramente più affidabile. Inoltre, ITC è molto sensibile anche al rumore di fondo che viene acquisito durante la registrazione del segnale. È importante sottolineare che, nonostante questa misura sia ottenuta esclusivamente da una stima della fase del segnale EEG e non dalla

sua ampiezza, è possibile che sia ancora influenzata dal rapporto tra risposta esplorata e attività di background. Infatti, se il rapporto segnale rumore di un potenziale evocato perfettamente phase-locked con la stimolazione è basso, l'ITC tenderà ad essere più basso poiché la stima della fase rifletterà principalmente l'attività del rumore di fondo. Invece, se l'SNR risulta essere alto, allora ITC tenderà ad essere più elevato rispecchiando soprattutto l'attività phase-locked. È importante quindi assicurarsi che le differenze ottenute nei calcoli ITC non siano il risultato di una differenza di SNR (Mouraux & Iannetti, 2008).

La misura statistica dell'ITC soffre però di un bias significativo in quanto la sua stima in realtà sovrastima la statistica sulla popolazione per campioni di dimensioni finite. Dal momento che il bias nasce a causa dell'operazione di addizione vettoriale, è possibile evitarlo definendo un altro tipo di misura che eviti questa operazione. È proprio per questo che Vink e colleghi hanno introdotto una nuova misura statistica circolare che prende il nome di PPC (*pairwise phase consistency*) (Vink et al., 2010) ed è definita come:

$$PPC = \frac{2}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{k=(j+1)}^N f(\theta_j, \theta_k) \quad 2.7$$

Dove N è il numero totale delle osservazioni, θ_j e θ_k sono le fasi relative a due osservazioni consecutive e $f(\theta_j, \theta_k)$ è la funzione che calcola il prodotto scalare tra due vettori unitari ed è definita come:

$$f(\varphi, \omega) = \cos(\varphi) \cos(\omega) + \sin(\varphi) \sin(\omega) \quad 2.8$$

La PPC calcola il coseno della distanza angolare assoluta (i.e., prodotto scalare tra vettori) per tutte le coppie date di fasi relative (i.e., quanto sia simile la fase relativa osservata in una prova alla fase relativa osservata in un'altra) e varia in un range di valori che va da -1 a 1 (Fig. 2.2, per rappresentazione grafica). Vink e colleghi hanno dimostrato che la stima della PPC risulta essere uno stimatore privo di bias a livello di statistica sulla popolazione considerata. Nel loro lavoro mostrano, sia analiticamente che mediante simulazioni numeriche, come la statistica della popolazione della PPC sia esattamente equivalente alla statistica della popolazione del PLV (o ITC) elevata al quadrato (Vink et al., 2010).

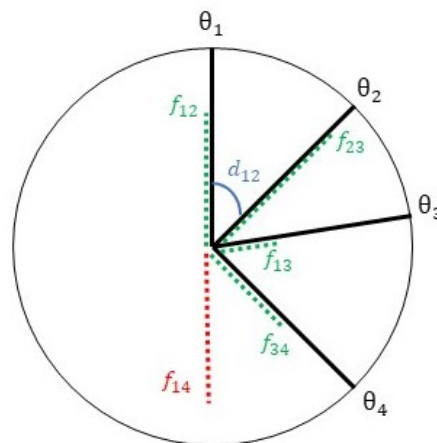


Figura 2.2 – Le linee nere rappresentano tutte le osservazioni della fase relativa compiute nel segnale. Le coppie uniche per il calcolo della PPC vengono generate tra tutte le diverse osservazioni e sono in totale $\frac{N*(N-1)}{2}$. In questo specifico caso, essendoci quattro diverse osservazioni, le coppie uniche risultano essere sei. Per ogni coppia è necessario calcolare la distanza angolare tra due vettori delle fasi indicata a titolo d'esempio in blu nella fig.1. Se la consistenza delle fasi è elevata, allora i vettori delle fasi relative avranno una distanza angolare l'uno rispetto all'altro molto ridotta. Viceversa, se la consistenza delle fasi è bassa, allora i vettori delle fasi relative avranno una distanza angolare elevata. Per ogni coppia viene calcolato il prodotto scalare tra i due vettori (i.e., coseno della distanza angolare) indicato con le linee tratteggiate. Quella rossa indica un prodotto scalare negativo, ovvero una distanza angolare maggiore di 90 gradi. Le linee tratteggiate verdi invece, indicano un prodotto scalare positivo.

La PPC è uguale al prodotto scalare medio tra tutte le coppie di osservazioni. Da notare nell'immagine che essendo la distanza angolare tra θ_2 e θ_4 pari a 90 gradi, il prodotto scalare è nullo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Stimoli e setup per l'acquisizione dei dati EEG

All'esperimento hanno partecipato undici italiani madrelingua destrorsi (5 femmine, età media 25 anni). Tutti i partecipanti avevano un'acuità visiva normale o corretta al normale e non hanno riportato alcuna storia di disturbi neurologici o psichiatrici. Tutti i partecipanti hanno fornito il consenso informato scritto per partecipare all'esperimento, precedentemente approvato dal Comitato Etico dell'Università di Trento.

Gli stimoli erano costituiti da una scacchiera (10x10 cm) composta da quadrati bianchi e neri sottostante approssimativamente $15^\circ \times 15^\circ$ di angolo visivo, su uno sfondo grigio uniforme, presentata ad una distanza di 80 cm dagli occhi del soggetto. Gli stimoli sono stati presentati utilizzando Psychtoolbox 3.0.12 per Windows in Matlab con una modulazione del contrasto on-off sinusoidale nel tempo del 100%. All'inizio di ogni ciclo, i quadrati della scacchiera erano grigi come lo sfondo, poi il contrasto veniva aumentato fino ad ottenere quadrati bianchi/neri alla metà esatta di un ciclo, che poi tornavano gradualmente ad essere grigi alla fine di esso. Le frequenze utilizzate per la presentazione degli stimoli erano di 0.8 Hz e 4 Hz rispettivamente in blocchi di 32 cicli (40 secondi) e 160 cicli (40 secondi). È stata utilizzata la modulazione con contrasto sinusoidale degli stimoli poiché generante meno armoniche (i.e., risposte dei soggetti a multipli della frequenza di stimolazione che riflettono la non linearità della risposta cerebrale (Norcia et al., 2015; Regan, 1989)) e perché, dal momento che la dinamica on-off è smooth, risulta essere per i soggetti una stimolazione visiva più piacevole e decisamente meno faticosa rispetto ad una modalità di stimolazione ad onda quadra.

Il paradigma sperimentale prevedeva che i soggetti fissassero il centro di una croce diagonale grigia che compariva sovrapposta alla scacchiera per cercare di attenuare il più possibile artefatti da movimento oculare e battiti di palpebra (*blinks*). Ad ogni soggetto veniva chiesto di rimanere il più possibile fermo e rilassato evitando contrazioni muscolari e cercando di non focalizzarsi su alcun tipo di pensiero. Ciascun partecipante veniva stimolato con due serie di blocchi per ogni frequenza di stimolazione. Lo studio includeva anche una serie di altre stimolazioni visive di volti schematici e gruppi di pallini, presentati in blocchi separati; poiché tali stimolazioni non riguardano l'obiettivo di questa tesi, questi blocchi sono stati ignorati nel presente lavoro.

L'esperimento è stato eseguito in una cabina elettricamente schermata e insonorizzata per evitare possibili interferenze. Il segnale elettroencefalografico è stato registrato con un amplificatore BrainAmp (Brain Products, Monaco, Germania) utilizzando 64 elettrodi ad anello sintetizzati Ag/AgCl montati in una cuffia elastica (Easycap, Monaco, Germania) e posizionati equidistanti secondo il sistema internazionale 10/20 (Klem et al., 1999). È stato utilizzato un riferimento di vertice (Cz) e un elettrodo di massa in AFz. Le impedenze degli elettrodi sono state mantenute al di sotto di 15 kOhm. I dati sono stati campionati a 500 Hz e analogicamente filtrati tra 0.016 e 250 Hz durante la registrazione.

3.2 Pre-processing

In questo paragrafo verranno presentati i diversi metodi e algoritmi che sono stati utilizzati per la rimozione degli artefatti dal segnale acquisito. Si tratta di una pipeline che permette di ottenere un segnale pulito da artefatti e pronto all'elaborazione. Per pipeline si intende un insieme di processi collegati tra di loro che portano al risultato desiderato.

I dati grezzi continui sono stati importati nel software EEGLAB (Delorme & Makeig, 2004) e filtrati con un passa-banda tra 0.1 e 40 Hz con il filtro EEGLAB predefinito (i.e., filtro FIR sinc con finestra di Hamming) per rimuovere il rumore continuo e ad alta frequenza. I dati sono stati poi segmentati in finestre corrispondenti ai blocchi di stimolazione. Ogni segmento è stato ispezionato visivamente e le porzioni contenenti artefatti parossistici non stereotipati sono state scartate. I canali contenenti salti di tensione maggiori di 200 μV sono stati scartati (nessun soggetto ne aveva più di uno). Per identificare e rimuovere gli artefatti stereotipati è stata utilizzata l'Independent Component Analysis (ICA) predefinita di EEGLAB sulla concatenazione di tutti i segmenti di segnale. L'ICA è una potente tecnica computazionale di *signal processing* con la quale è possibile separare un segnale in sottocomponenti indipendenti avendo così la possibilità successivamente di rimuovere quelle artefattuali. Questa tipologia di intervento si basa sul presupposto che i segnali EEG provengano da fonti temporalmente e spazialmente indipendenti (i.e., quando il verificarsi di uno non modifica la probabilità di verificarsi dell'altro) e che possano essere modellati come una combinazione lineare di fonti corticali e non corticali con percorsi temporali indipendenti.

Per definizione, dato un set di N osservazioni di variabili casuali $\langle x_1(t), \dots, x_N(t) \rangle$, assumendo che siano una combinazione lineare di componenti indipendenti, si può esprimere ICA come $\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s}$ dove A è una matrice di valori ignoti e s è il vettore delle sorgenti. L'ICA quindi stima sia la matrice A sia le sorgenti s a partire dal set di osservazioni indipendenti x . Proprio per questo è facile notare come questa metodologia calzi nel migliore dei modi con l'elettroencefalografia dal momento che i potenziali misurati agli elettrodi, che corrispondono al set di osservazioni, vengono generati da diversi fattori (o sorgenti) che possono essere sia cerebrali che di altra natura. È quindi

possibile, tramite ICA, separare le componenti del segnale provenienti dal cervello e quelle generate da qualche fattore esterno. Nel caso specifico di questo studio, è stata utilizzata la funzione *pop_runica* presente in EEGLAB attraverso la quale vengono restituite le componenti in ordine decrescente rispetto alla varianza EEG di ciascun componente.

Una volta separate le componenti attraverso ICA si rende necessaria la loro classificazione e suddivisione per poter poi scartare quelle artefattuali che non fanno parte della risposta neurale. Tuttavia, durante questa fase può spesso risultare complicato individuare quali siano le effettive componenti da eliminare, soprattutto in caso di segnale molto rumoroso. La procedura di selezione e rimozione delle componenti corrotte può essere svolta manualmente scartandole singolarmente attraverso un'ispezione visiva. Questo però comporta, nella buona riuscita del processo, una forte dipendenza dallo sperimentatore, oltre al fatto che è necessario tenere conto che il numero di componenti da visionare per ogni soggetto è molto grande (uguale al numero di elettrodi, 64). Proprio per questo, battiti di palpebra, movimenti oculari e altri artefatti localizzati topograficamente sono stati selezionati ed eliminati rimuovendo i corrispondenti componenti indipendenti tramite ADJUST, un algoritmo per il rilevamento automatico di componenti ICA artefatti (Mognon et al., 2011).

L'algoritmo è stato creato partendo da due presupposti fondamentali. Il primo secondo cui le componenti indipendenti per un gran numero di artefatti sono caratterizzate da peculiarità stereotipate sia nel loro andamento temporale che nella distribuzione spaziale. Il secondo invece, riguarda le singole caratteristiche dei due domini citati che potrebbero non essere sufficientemente accurate nel discriminare tra artefatto e segnale, mentre con la loro combinazione risulta essere molto più semplice. ADJUST è in grado di adattare

automaticamente i suoi parametri ai dati analizzati così da riuscire a calcolare l'insieme delle caratteristiche spaziale e temporali necessarie alla classificazione delle componenti indipendenti. Una volta che il segnale è stato scomposto nelle componenti indipendenti, ADJUST prende in considerazione quattro classi di artefatti, tre delle quali sono relative ad artefatti oculari (i.e., battiti di ciglia, movimenti oculari verticali e orizzontali), mentre la quarta è una classe generica dedicata al riconoscimento di attività anomala di registrazione dei singoli elettrodi dovuta a condizioni di alta impedenza o instabilità elettriche nel dispositivo utilizzato per la registrazione. Per ogni tipo di artefatto viene calcolato un insieme di caratteristiche spaziali e temporali specifiche relative a tutte le componenti indipendenti in cui il segnale è stato scomposto. Viene così stimata una soglia attraverso la quale vengono divise le componenti artefatte, se tutte le componenti spaziali e temporali specifiche superano quel valore di soglia, da quelle non artefatte (Mognon et al., 2011).

Una volta completato questo step sono stati eliminati gli artefatti muscolari rimuovendo i relativi componenti ICA identificati mediante ispezione visiva della loro topografia e del profilo spettro-temporale. I segnali EEG nei canali corrotti sono stati interpolati con i segnali EEG dai canali vicini, attraverso il metodo di interpolazione sferica standard in EEGLAB. Infine, sui dati puliti è stato effettuato il re-referencing, ovvero è stato ricalcolato l'elettrodo di riferimento come media degli elettrodi dopo la rimozione degli artefatti (Liu et al., 2015). Questo porta ad un vantaggio non indifferente poiché così facendo la somma delle correnti positive e negative uscenti dalla superficie dello scalpo viene annullata e resa uguale a zero e quindi anche la somma dei campi elettrici misurati agli elettrodi risulta essere nulla.

3.3 Frequency tagging

Una volta che il segnale acquisito è stato ripulito dagli artefatti in fase di pre-processing, esso è stato salvato, per ogni soggetto e per ogni trial di acquisizione, all'interno di una matrice. Attraverso EEGLAB (Delorme & Makeig, 2004) sono stati caricati nel workspace di Matlab i dati degli 11 soggetti adulti. Innanzitutto, per ogni soggetto è stato estratto il segmento di segnale corrispondente ai primi 25 secondi, ovvero i primi 12500 bin, essendo la frequenza di campionamento di 500 Hz (i.e., numero di campioni presenti all'interno di 1 secondo di segnale). Per questo segmento di segnale sono state calcolate le seguenti misure: Power Spectrum (PS), Evoked Power Spectrum (EPS), Inter Trial Phase Coherence (ITC) e Pairwise Phase Consistency (PPC).

3.3.1 Power Spectrum

Per ottenere una risoluzione ad alta frequenza dello spettro di potenza con un bin centrato sulla frequenza di stimolazione, la lunghezza della finestra utilizzata per calcolare il PS è stata impostata a 10 secondi (i.e., 5000 bin temporali), corrispondente a una risoluzione in frequenza di 0.1 Hz, e a 5 secondi (i.e., 2500 bin temporali), corrispondente a una risoluzione in frequenza di 0.2 Hz. Queste finestre sono state sovrapposte nel segnale tra metà e tre quarti della loro lunghezza per riuscire ad includere così tutti i bin. Per ogni elettrodo di tutti i soggetti è stata calcolata la trasformata di Fourier $F_m(f)$ (Equazione 2.1) utilizzando l'algoritmo della Fast Fourier Transform presente in Matlab (funzione *fft*). Lo spettro di potenza è stato calcolato da questi coefficienti di Fourier come media dello spettro di potenza di ogni singola finestra:

$$PS_m(f) = \langle F_m(f)F_m^T(f) \rangle_w \quad 3.1$$

dove m sono i soggetti e w indica le finestre utilizzate per il calcolo.

L'FTR (i.e., *frequency-tagged response*) è stato calcolato come il rapporto tra il power spectrum alla frequenza di tag e il corrispondente valore del fit della legge potenza stimato da 6 bin di frequenza adiacenti (± 0.3 Hz) per il PS calcolato con finestra di 10 secondi e 2 bin di frequenza adiacenti (± 0.2 Hz) per il PS calcolato invece con finestra di 5 secondi.

Il fit della legge potenza è stato calcolato come in Buiatti et al., 2019, adattando una retta al logaritmo della potenza in corrispondenza dei rispettivi bin di frequenza adiacenti (funzione Matlab *Polyfit*).

Non è stato utilizzato il classico metodo per stimare lo spettro della potenza di background alla frequenza di tag, che consiste semplicemente nel fare la media dei bin di frequenza adiacenti (Buiatti et al., 2009), a causa della ripida legge di potenza del PS nell'intervallo a basse frequenze analizzato. Ciò avrebbe causato una sovrastima della potenza di background e quindi una conseguente sottostima dell'FTR poiché lo spettro di potenza è molto più ripido per i bin a frequenza inferiore rispetto ai bin a frequenza superiore intorno alla frequenza di tag.

3.3.2 Evoked power spectrum

Per l'EPS è stato sfruttato lo stesso procedimento con qualche piccola modifica. È stata utilizzata solamente una finestra di 5 secondi con scorrimento nel segnale senza sovrapposizioni. Non è stata presa, come invece è stato fatto nel caso del power spectrum, una finestra di 10 secondi poiché sarebbe stata equivalente al segmento di segnale più corto da analizzare. Non ci sarebbe stata quindi la possibilità di fare la media tra le finestre rendendo la misura identica al power spectrum. A differenza del metodo precedentemente descritto, il calcolo dell'evoked power spectrum è stato fatto prima mediando il segnale

attraverso le finestre, successivamente calcolando la trasformata di Fourier attraverso la funzione Matlab *fft* e infine calcolando dai risultati di quest'ultima lo spettro.

3.3.3 Inter trial phase coherence e pairwise phase consistency

A questo punto sono stati calcolati i valori di ITC e PPC per il segmento di segnale a 25 secondi con finestre di 5 secondi (i.e., 2500 bin) e 2.5 secondi (i.e., 1250 bin). Anche in questo caso per ogni elettrodo di ogni soggetto sono stati calcolati i valori di fase attraverso la trasformata di Fourier lungo le rispettive finestre consecutive e non sovrapposte. Questo perché i valori della fase devono essere calcolati una sola volta per ogni elemento complesso del segnale dato dalla trasformata di Fourier. Dai valori della fase sono stati calcolati ITC (Equazione 2.6) e PPC. Per il calcolo della PPC abbiamo fatto riferimento all'articolo pubblicato da Aydore e colleghi, i quali hanno fornito una formula esplicita e di semplice utilizzo per il calcolo della misura (Aydore et al., 2013).

$$PPC = \frac{1}{N - 1} (ITC^2 \times N - 1) \quad 3.2$$

3.4 Analisi statistica

Per procedere all'analisi di significatività statistica delle misure ITC e PPC attraverso i soggetti, sono stati generati per entrambe le misure dei dati surrogati, 100 per tipo, calcolati secondo il metodo descritto in Henin e colleghi (2021), per valutare la distribuzione nell'ipotesi nulla di attività oscillatoria (Henin et al., 2021). Per la generazione dei dati surrogati è stata utilizzata la funzione *shuffle* di Matlab sulla matrice

delle fasi reali. Attraverso questa abbiamo quindi creato i surrogati permutando i valori di fase per ogni elettrodo e per ogni finestra, mescolando le fasi alle diverse frequenze. Successivamente i valori di ITC e PPC surrogati sono stati calcolati inserendo i valori delle fasi surrogate nelle equazioni 3.2 e 2.6. Solo i valori che si discostavano in modo significativo da questa distribuzione nulla potevano quindi essere considerati rivelatori della presenza di phase-locking. È stata calcolata poi la media dei cento valori di ITC e PPC surrogati, per ogni elettrodo di ogni soggetto, con lo scopo di costruire una stima stabile della distribuzione surrogata.

3.4.1 Ground truth

La natura dei dati che abbiamo a disposizione influenza in modo significativo il tipo di statistica più adatto per confrontare due condizioni. I nostri dati EEG, registrati su tanti elettrodi contemporaneamente, portano alla luce il problema dei confronti multipli (*multiple comparisons problem*). Esso consiste nel fatto che l'effetto di interesse, ovvero una differenza tra due condizioni, viene valutato in un numero estremamente elevato di coppie comportando il rischio di ottenere dei falsi positivi. Avendo noi a disposizione tutti i dati necessari, PS ed EPS alla frequenza di tag con PS ed EPS della baseline calcolati dal fit della legge potenza, ITC e PPC reali alla frequenza di tag con ITC e PPC surrogati, abbiamo svolto per tutte e sette le misure (i.e., PS con finestra di 10 secondi, PS con finestra di 5 secondi, EPS con finestra di 5 secondi, ITC e PPC con finestre di 5 e 2.5 secondi) un'analisi statistica dei cluster non parametrica ad una coda utilizzando il toolbox di Matlab FieldTrip (Oostenveld et al., 2011). Questa statistica ci permette di risolvere il problema dei confronti multipli. Per ogni elettrodo le due condizioni vengono confrontate mediante un valore che ne quantifica l'effetto facendo uso della statistica T

dei campioni dipendenti. Vengono così selezionati gli elettrodi che riportano un valore t statistico superiore alla soglia α . Questa soglia non ha nulla a che vedere con la probabilità di errore ma è un semplice valore utile solamente a considerare un campione come membro del cluster. Se α viene fissata a 0.05 a seconda che il test sia ad una o a due code, i valori di t vengono sogliaati al 95° quantile o al 97.5° quantile rispettivamente. Una volta ottenuti i vari insiemi, le statistiche vengono calcolate come somma dei valori t all'interno del cluster. Per calcolare la probabilità di significatività di questa statistica basata sui cluster è stato utilizzato il metodo Monte Carlo. Se il valore p così ottenuto risulta essere inferiore ad una soglia critica (tipicamente 0.05) allora i dati nelle due condizioni possono essere considerati significativamente diversi.

A questo punto, una volta che abbiamo ottenuto tutti i cluster significativi per le 7 misure per il segmento di segnale a 25 secondi, è stata svolta una conjunction analysis tramite la funzione `ft_conjunctionanalysis` di Fieldtrip (Oostenveld et al., 2011) (https://github.com/fieldtrip/fieldtrip/blob/master/ft_conjunctionanalysis.m) al fine di individuare gli elettrodi significativi e quindi maggiormente sollecitati dalla stimolazione.

3.4.2 Wilcoxon Signed Rank Test

Negli elettrodi scelti, è stato effettuato un *Wilcoxon Signed Rank Test* (Scheff, 2016) tra i valori della risposta alla frequenza di tag e la rispettiva baseline per le misure basate sulla potenza spettrale. Per le misure basate sulla fase invece, sono stati confrontati i valori alla frequenza di tag con i dati surrogati. Questo è un test non parametrico appropriato per un paradigma sperimentale a misure ripetute dove la distribuzione dei dati non risulta essere gaussiana per la presenza di outlier. È l'equivalente non parametrico del *paired t-test* parametrico e assume che i dati da testare provengano da una

distribuzione continua. Nell'approssimazione normale, attraverso questo test statistico, è possibile verificare l'ipotesi che la distribuzione delle differenze abbia una mediana pari a zero (mediana e media sono le stesse in una distribuzione normale). Il *signed rank test* risulta essere più potente del test dei segni in quanto considera l'entità della differenza in una coppia di dati mentre il test dei segni no. Abbiamo utilizzato questo test per ottenere un risultato statistico indipendentemente dalla varianza dei dati a disposizione, cosa che non viene fatta con il semplice *t-test*. Per eseguire il test abbiamo utilizzato la funzione di Matlab *signrank* la quale richiede in input i vettori con i dati corrispondenti alle due condizioni che si vogliono confrontare e restituisce in output il valore di *p-value*.

4. RISULTATI

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti dall'analisi del segnale elettroencefalografico mediante le diverse misure sopra citate.

Nella prima parte vengono presentati i risultati relativi alla risonanza che il segnale presenta nel caso del "ground truth", ovvero nel caso con maggior quantità di statistica (nel nostro caso segmento di segnale più lungo). Per la risonanza che il segnale ha a 0.8 Hz (frequenza d'interesse per futuri lavori con i neonati), abbiamo preso in considerazione gli 11 soggetti acquisiti alla frequenza di stimolazione di 0.8 Hz (condizione 1) e di 4 Hz come controllo (condizione 2). Per la risonanza che il segnale presenta a 4 Hz invece, abbiamo preso in considerazione gli 11 soggetti acquisiti alla frequenza di stimolazione di 4 Hz (condizione 3).

Successivamente nella seconda parte di lavoro vengono descritte le criticità che possono emergere nell'utilizzo delle misure di potenza e fase nell'extrapolare una risposta neurale nel caso in cui si analizzi un segmento di segnale via via sempre più piccolo. Il caso limite è stato definito come quello di otto cicli di stimolazione in cui viene utilizzata un'unica finestra per il calcolo delle misure di potenza e due finestre per le misure di fase. Anche in questo caso specifico sono state fatte le analisi nelle tre condizioni sopra citate.

Nelle analisi relative alla risonanza a 4 Hz per i soggetti acquisiti a 4 Hz, le ipotesi iniziali prevedevano una risposta più forte rispetto alla risonanza a 0.8 Hz per i soggetti acquisiti a 0.8 Hz.

Non sono stati presi in considerazione dati relativi alla risonanza a 4 Hz per i dati degli 11 soggetti acquisiti alla frequenza di stimolazione di 0.8 Hz come controllo della condizione

3, dal momento che le misure utilizzate avrebbero potuto rilevare l'attività cerebrale relativa alla quinta armonica della frequenza di stimolazione.

Infine, le stesse analisi sono state svolte anche per un'ulteriore misura di fase allo scopo di avere una panoramica metodologica ancora più ampia.

In tutte le analisi sono stati utilizzati i dati puliti dagli artefatti nella fase di pre-processing del segnale.

4.1 Attivazione nel caso del ground truth

Il primo step di analisi ha avuto lo scopo di valutare l'andamento del segnale nel caso del *ground truth* per tutte e tre le condizioni. L'obiettivo era quello di evidenziare quali fossero gli elettrodi più significativi e quindi maggiormente stimolati su cui poi utilizzare le misure in funzione della lunghezza dei dati.

4.1.1 Risonanza a 0.8 Hz

In questo caso specifico è stato preso in considerazione il segmento di segnale di 25 secondi (i.e., maggior quantità a disposizione), allo scopo di analizzarlo attraverso le seguenti misure: Power Spectrum con finestra di 10 secondi (8 cicli di stimolazione, PS8), Power Spectrum con finestra di 5 secondi (4 cicli di stimolazione, PS4), Evoked Power Spectrum con finestra di 5 secondi (4 cicli di stimolazione, EPS4), Inter Trial Phase Coherence con finestra di 5 secondi (4 cicli di stimolazione, ITC4) e Inter Trial Phase Coherence con finestra di 2.5 secondi (2 cicli di stimolazione, ITC2). Per compiere questo tipo di analisi e per scegliere quali fossero gli elettrodi della cuffia più significativi e stimolati è stato utilizzato il test statistico di permutazione basato sui cluster (Oostenveld et al., 2011) implementato da un algoritmo non parametrico che analizza gli effetti

sull'intero set di elettrodi senza una selezione della regione di interesse alla base come spiegato precedentemente nel paragrafo 3.4.1. Ciò porta a non avere alcun tipo di bias dovuto al fatto che ci si aspetterebbe attività in una specifica area del cervello e quindi una conseguente selezione a priori della regione di interesse. È stato fatto questo test fissando l'indice di significatività al valore di $\alpha = 0.05$. I cluster significativi ottenuti sono rappresentati in Fig.4.1A per la condizione 1 e in Fig.4.1B per la condizione 2.

È facile notare come per la prima condizione i cluster significativi risultino essere popolati da una moltitudine di elettrodi localizzati per la maggior parte nella zona occipitale e frontale del cervello (PS8: 1 cluster con p -value (p) = 0; PS4: 1 cluster occipitale con $p < 0.0059$ e 1 cluster frontale con $p < 0.021$; EPS4: 1 cluster con $p < 0.00098$; ITC4: 1 cluster con $p = 0$; ITC2: 1 cluster con $p = 0$) dove la stimolazione ha suscitato una risposta significativamente maggiore rispetto all'attività di fondo stimata. Per la condizione di controllo invece, non vi è alcun cluster significativo.

Per proporre una scelta ancora più accurata degli elettrodi maggiormente sollecitati è stato quindi compiuto nuovamente il test statistico alzando la soglia di significatività e ponendo $\alpha = 0.01$. Con i cluster significativi ottenuti attraverso questa soglia molto più rigida è stata svolta una conjunction analysis (Oostenveld et al., 2011) dalla quale è stato ottenuto come cluster finale l'insieme degli elettrodi 48, 49, 50, 55, 56, 57 (topografia Fig.4.2A e Fig.4.2B). In questo cluster di elettrodi sono stati plottati gli andamenti della risposta rilevata dalle cinque misure con le rispettive fasce di deviazione standard in contrapposizione al rumore di fondo tratteggiato (Fig.4.1A; Fig.4.1B).

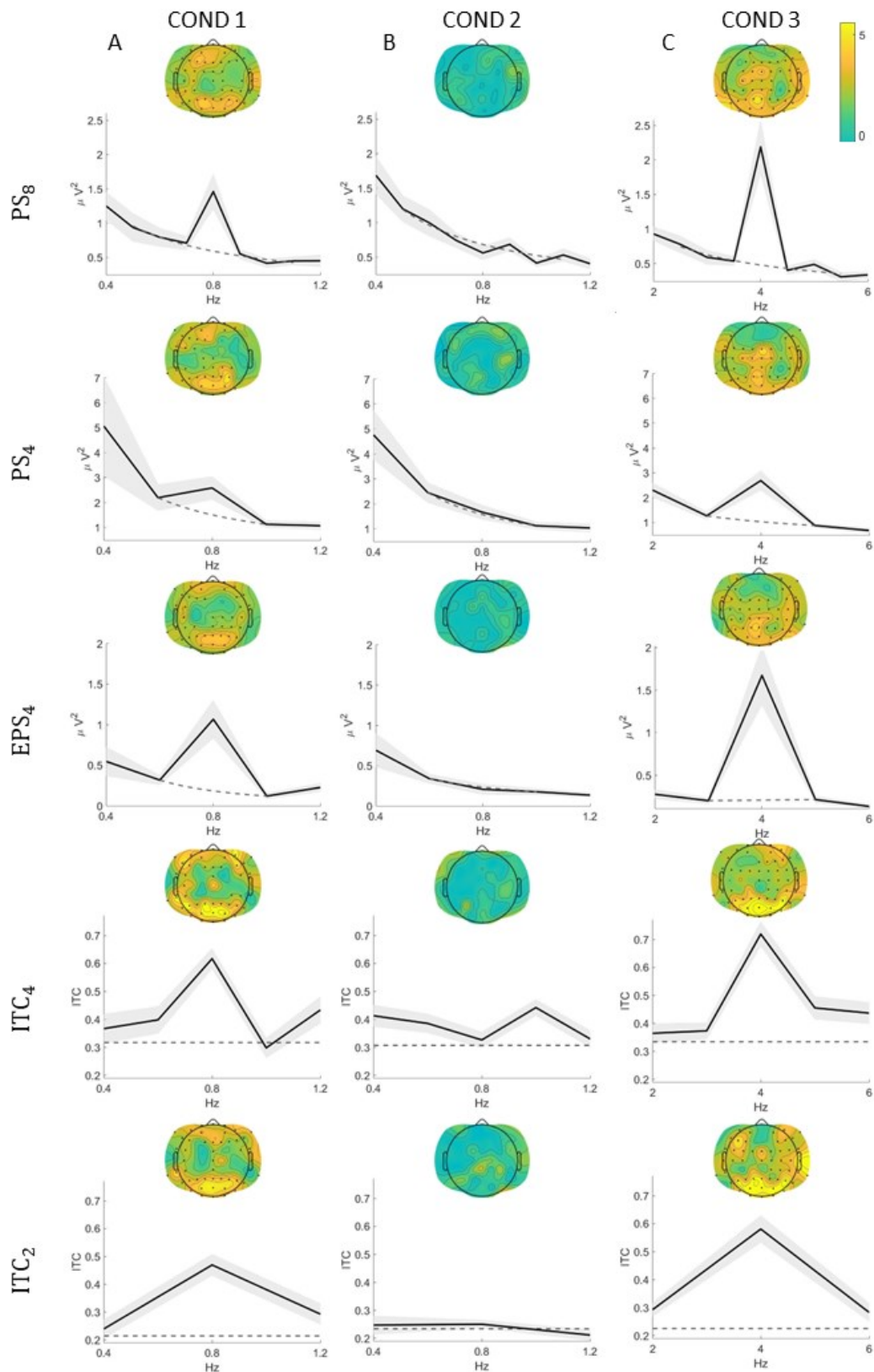


Figura 4.1 – Topografie ottenute attraverso un'analisi statica non parametrica sui cluster con indice di significatività fissato a $\alpha = 0.05$ per ogni misura e per ogni condizione. Per ogni

topografia, visualizzazione dell'andamento del segnale nel cluster di elettrodi finale ottenuto tramite test non parametrico con $\alpha = 0.01$ e successiva conjunction analysis. La parte ombreggiata corrisponde alla deviazione standard del segnale mentre la linea tratteggiata corrisponde alla stima del rumore di fondo per le misure di potenza (prime tre righe) e alla media dei dati surrogati per le misure di fase (ultime due righe). Le tre condizioni corrispondono a COND 1: risonanza a 0.8 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 0.8 Hz, COND 2: risonanza a 0.8 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 4 Hz e COND 3: risonanza a 4 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 4 Hz.

Per valutare la risonanza alla frequenza di stimolazione di 0.8 Hz e dato il ripido profilo del power spectrum, abbiamo stimato la potenza di fondo non correlata allo stimolo alla frequenza di tag attraverso un fit della legge potenza dei 6 bin adiacenti a quello di tag (± 0.3 Hz) per PS8 e dei 2 bin adiacenti a quello di tag (± 0.2 Hz) per PS4 ed EPS4.

Per ITC invece, abbiamo generato attraverso permutazioni 100 dati surrogati successivamente mediati per ogni elettrodo. È stata studiata quindi la presenza di una risposta ad una specifica frequenza (FTR) per PS ed EPS valutando se la potenza alla frequenza di tag fosse significativamente superiore alla potenza stimata mediante il fit della legge potenza. Allo stesso modo sono stati analizzati i valori ottenuti dal calcolo di ITC confrontandoli con la distribuzione surrogata.

La risonanza a 0.8 Hz per i soggetti acquisiti alla frequenza di stimolazione di 0.8 Hz, per il caso del *ground truth*, risulta essere molto forte in tutte e cinque le misure.

4.1.2 Risonanza a 4 Hz

Allo scopo di mantenere lo stesso numero di cicli di stimolazione della risonanza a 0.8 Hz, aspetto fondamentale nell'analisi in frequenza del segnale, abbiamo apportato delle variazioni sulla lunghezza della finestra di calcolo e sul *ground truth*. In questo caso, infatti, le cinque misure usate sono state: Power Spectrum con finestra di 2 secondi (8 cicli di stimolazione, PS8), Power Spectrum con finestra di 1 secondo (4 cicli di stimolazione, PS4), Evoked Power Spectrum con finestra di 1 secondo (4 cicli di stimolazione, EPS4), Inter Trial Phase Coherence con finestra di 1 secondo (4 cicli di stimolazione, ITC4) e Inter Trial Phase Coherence con finestra di mezzo secondo (2 cicli di stimolazione, ITC2). Inoltre, il segmento di segnale considerato come *ground truth* era di 5 secondi.

Il primo test non parametrico con l'indice di significatività fissato a $\alpha = 0.05$ ha evidenziato i cluster rappresentati in Fig.4.1C (condizione 3). I cluster significativi sono formati da molti elettrodi, quasi la totalità della cuffia, con una predominanza della regione occipitale (PS8: 1 cluster con $p = 0$; PS4: 1 cluster con $p = 0$; EPS4: 1 cluster con $p = 0$; ITC4: 1 cluster con $p = 0$; ITC2: 1 cluster con $p = 0$). È stato ripetuto anche in questo caso il test statistico con una soglia più rigida $\alpha = 0.01$ e svolto la conjunction analysis con i cluster significativi risultanti. È stato così ottenuto il cluster definitivo comprendente gli elettrodi 46, 48, 49, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 (topografia Fig.4.2C). È importante notare come in questo caso i plot che mettono a confronto andamento della risposta con varianza e stima del background (Fig.4.1C), mostrino un picco alla frequenza di stimolazione più alto rispetto al caso di 0.8 Hz e la stima del rumore di fondo è più bassa.

4.2 Stima della risposta neurale al diminuire della lunghezza di segnale

Secondo step delle analisi è stato quello di valutare l'andamento del segnale e l'efficacia delle misure nelle tre condizioni. L'obiettivo era quello di valutare quale fosse la misura più efficace in condizioni di stimolazione a bassa frequenza e lunghezza del segnale molto ridotta.

4.2.1 Risonanza a 0.8 Hz

Abbiamo testato attraverso le cinque misure (PS8, PS4, EPS4, ITC4, ITC2), se con intervalli di dati brevi (25, 20, 15, 10 secondi per ogni misura) e ad una frequenza di stimolazione bassa fosse possibile misurare in modo affidabile ed efficace una risposta oscillatoria significativa e quale fosse delle cinque la misura più robusta in termini di sensibilità al rumore e rilevazione dell'attività cerebrale.

I *Wilcoxon Signed Rank Test* svolti sugli elettrodi selezionati nell'analisi del *ground truth* mostrano dei risultati interessanti. Innanzitutto, per 25, 20 e 15 secondi di segnale tutte e cinque le misure risultano essere statisticamente significative rispetto ad entrambe le soglie fissate (Fig.4.2A).

Per i due casi con maggior quantità di segnale (25 e 20 secondi), le misure con più cicli di stimolazione nelle finestre di calcolo (PS8, EPS4, ITC4) risultano essere le migliori da utilizzare rispetto a PS4 e ITC2. Nel caso critico invece, 10 secondi di segnale, entrambe le misure di fase e l'evoked-power spectrum subiscono un crollo. ITC2 non è più significativa rispetto alla soglia più rigida impostata al 99% e ITC4 assieme a EPS4 nemmeno rispetto alla soglia impostata al 95%. Le misure migliori risultano essere i due power spectrum (PS8 e PS4), la cui significatività statistica decresce lentamente al

diminuire della durata del segnale. Tutto questo porta alla conclusione che, passando da situazioni con quantità di segnale abbondante ad una situazione più critica in cui il segnale scarseggia, le misure più affidabili per rilevare una risposta neurale non sono le stesse. Come per le topografie, anche nei risultati del *signed rank test* nella condizione di controllo abbiamo ottenuto dei risultati attesi. Tutti i valori dei *p-value* si trovano al di sotto della soglia meno rigida fissata al 95% a dimostrazione di come non ci sia nessun effetto (Fig.4.2B). Anche l'analisi soggetto per soggetto con le misure PS8 e ITC4 segue i risultati ottenuti nel *signed rank test* (Fig.4.3A e Fig.4.3B). Per 25 secondi di segnale è facile notare come l'effetto della risposta sia di gran lunga superiore rispetto a quello della baseline in entrambe le misure. Nel caso critico di 10 secondi di segnale invece, il power spectrum rimane affidabile in 10 soggetti su 11 mentre l'ITC subisce un decremento (Fig.4.3A seconda riga). Anche in questo caso si vede come gli istogrammi per la condizione di controllo (Fig.4.3B) rispecchino l'assenza di attività alla frequenza di 0.8 Hz andando di pari passo a quanto ottenuto per topografie e *signed rank test* (Fig.4.1B; Fig.4.2B). I valori di FTR espressi soggetto per soggetto mostrano la presenza di alcuni "outlier" positivi molto elevati. Questo fattore porta ad avere una varianza molto alta tra i dati del power spectrum e una distribuzione leggermente lontana da quella gaussiana. È proprio per questo che abbiamo pensato di eseguire un test statistico non parametrico.

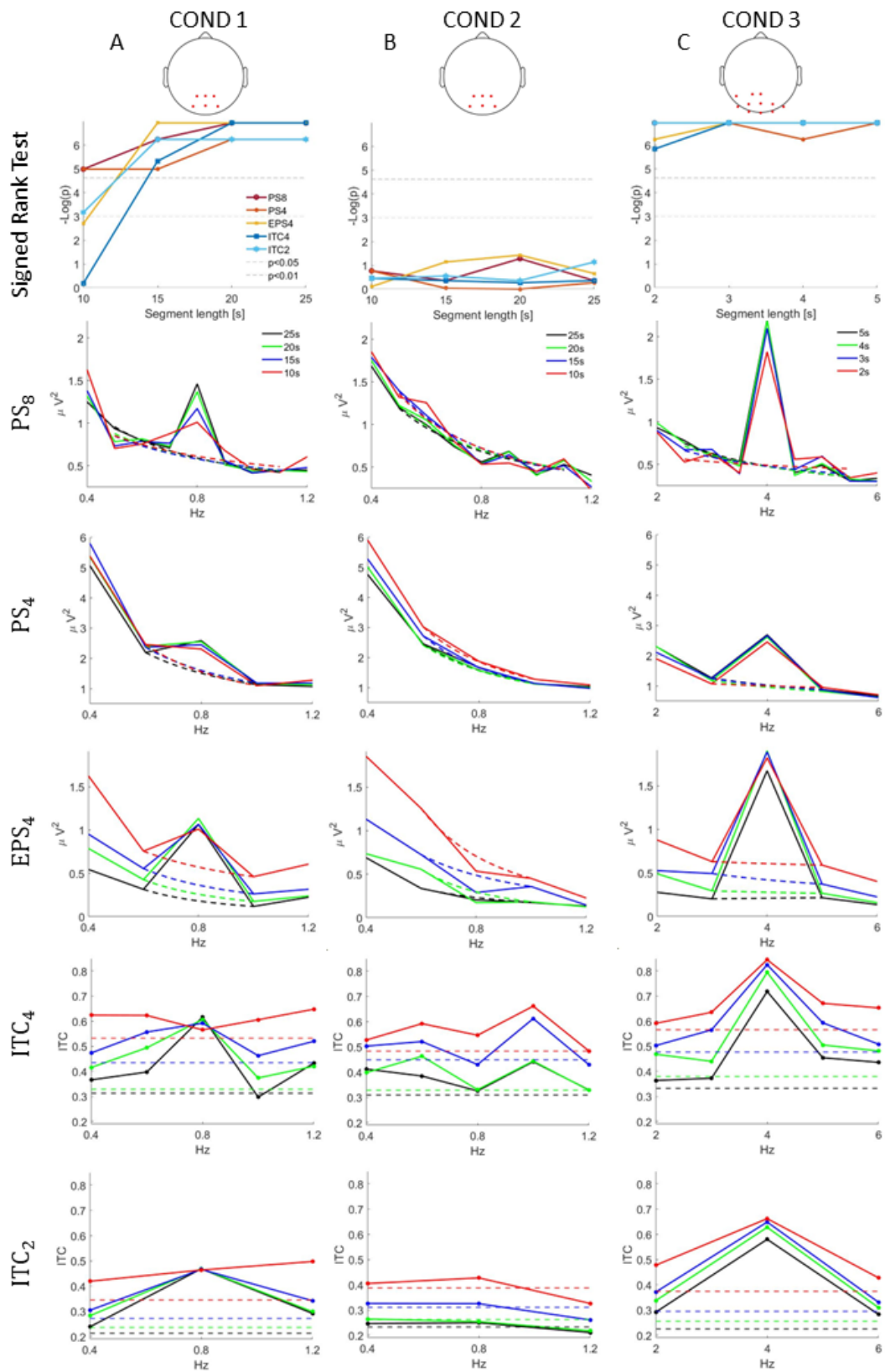


Figura 4.2 – Prima riga: visualizzazione del cluster significativo ottenuto dalla conjunction analysis con rispettivo wilcoxon signed rank test in tutte e tre le condizioni. Dalla seconda riga

in poi: visualizzazione della sovrapposizione delle lunghezze di segnale considerate, per ogni misura in ogni condizione. Le linee tratteggiate corrispondono alla stima del rumore di fondo per le tre misure di potenza (seconda, terza e quarta riga) e alla media dei surrogati per le due misure di fase (quinta e sesta riga).

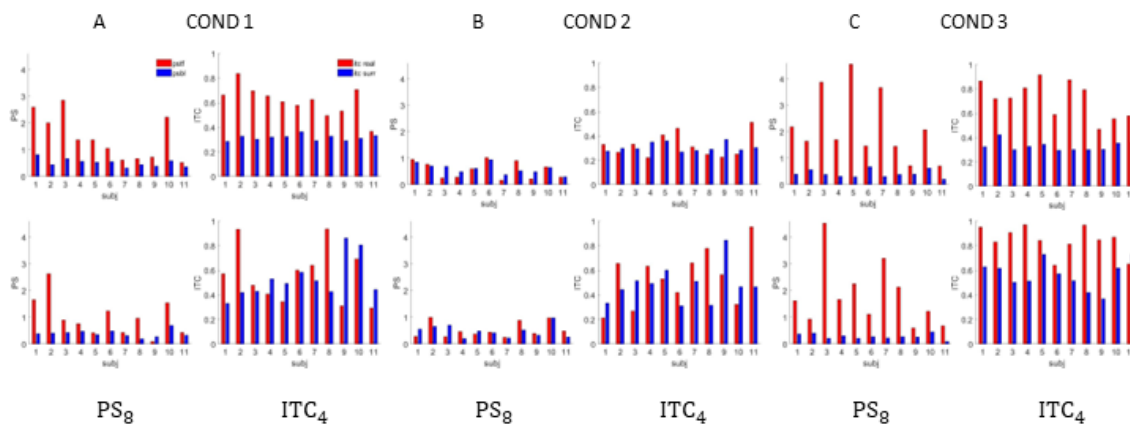


Figura 4.3 – Visualizzazione dei risultati dell’analisi soggetto per soggetto effettuata in tutte e tre le condizioni solo per power spectrum ed itc con maggior numero di cicli di stimolazione compresi nel calcolo delle misure (PS_8 : 8 cicli; ITC_4 : 4 cicli). A & B prima riga: analisi svolta in 25 secondi di segnale. A & B seconda riga: analisi svolta in 10 secondi di segnale. C prima riga: analisi svolta in 5 secondi di segnale. C seconda riga: analisi svolta in 2 secondi di segnale. Si noti che la variazione della lunghezza del segnale considerato nella condizione 3 è stata fatta al fine di avere la stessa quantità di cicli di stimolazione presenti in condizione 1 e condizione 2.

4.2.2 Risonanza a 4 Hz

Anche in questo caso abbiamo utilizzato, per mantenere lo stesso numero di cicli di stimolazione considerati per le condizioni 1 e 2, le cinque misure con finestre di calcolo ridotte per analizzare segmenti di segnale di lunghezza decrescente (5, 4, 3, 2 secondi).

I *signed rank test* svolti nel cluster congiunto mostrano che in questa condizione di stimolazione tutte e cinque le misure a tutte e quattro le diverse lunghezze di segnale sono significative rispetto la soglia più rigida (Fig.4.2C). Nella situazione critica, per 2 secondi di segnale, ITC calcolato con una finestra di mezzo secondo (ITC2) assieme ai due power spectrum (PS8, PS4) risultano essere le misure più affidabili e robuste (Fig.4.2C). Attraverso l'analisi soggetto per soggetto è possibile notare come in questa condizione il power spectrum (Fig.4.3C prima colonna) risulta avere dei valori molto più alti rispetto a quelli ottenuti nella prima condizione (Fig.4.3A prima colonna) dove il segnale è molto più forte. Allo stesso tempo i valori del background (Fig.4.3C prima colonna) sono molto più bassi per la stimolazione a 4 Hz rispetto a quella a 0.8 Hz (Fig.4.3A prima colonna).

4.3 Analisi supplementare della coerenza di fase con la Pairwise

Phase Consistency

Per avere una panoramica metodologica ancora più ampia abbiamo svolto tutte le analisi anche attraverso la Pairwise Phase Consistency con finestre di calcolo esattamente uguali a quelle utilizzate per ITC al fine di avere sempre lo stesso numero di cicli di stimolazione. Abbiamo provato anche quest'ultima misura dal momento che in letteratura viene considerata una tecnica molto robusta per dati brevi non dipendendo, a differenza dell'ITC, dal numero di epoche a disposizione.

Per il caso del *ground truth* (Fig.4.4), l'andamento dei risultati è sulla stessa linea di quelli ottenuti con l'ITC sia per la risonanza a 0.8 Hz sia per la risonanza a 4 Hz. Di fondamentale importanza sono i risultati ottenuti con il *signed rank test* nella condizione 1 e nella condizione 3 (Fig.4.5A prima riga; Fig.4.5C prima riga). Essi mettono in luce, nel nostro caso specifico, come entrambe le misure di PPC (PPC4 e PPC2) siano statisticamente peggiori se confrontate con le rispettive misure di ITC (ITC4 e ITC2).

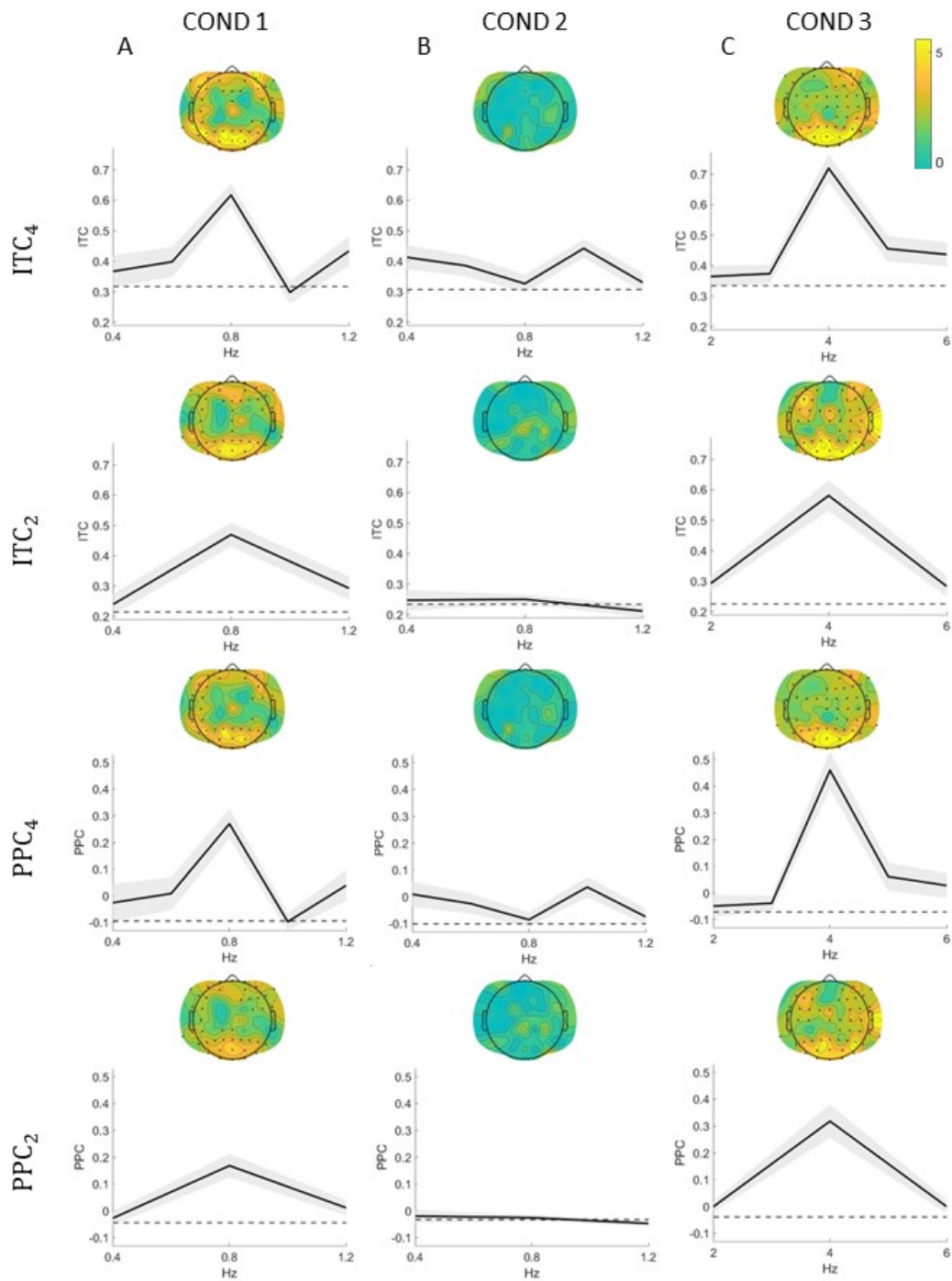


Figura 4.4 – Topografie ottenute attraverso un'analisi statica non parametrica sui cluster con indice di significatività fissato a $\alpha = 0.05$ per ogni misura e per ogni condizione. Per ogni topografia, visualizzazione dell'andamento del segnale nel cluster di elettrodi finale ottenuto tramite test non parametrico con $\alpha = 0.01$ e successiva conjunction analysis. La parte

ombreggiata corrisponde alla deviazione standard del segnale mentre la linea tratteggiata corrisponde alla media dei dati surrogati. Le tre condizioni corrispondono a COND 1: risonanza a 0.8 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 0.8 Hz, COND 2: risonanza a 0.8 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 4 Hz e COND 3: risonanza a 4 Hz per soggetti acquisiti ad una frequenza di stimolazione di 4 Hz.

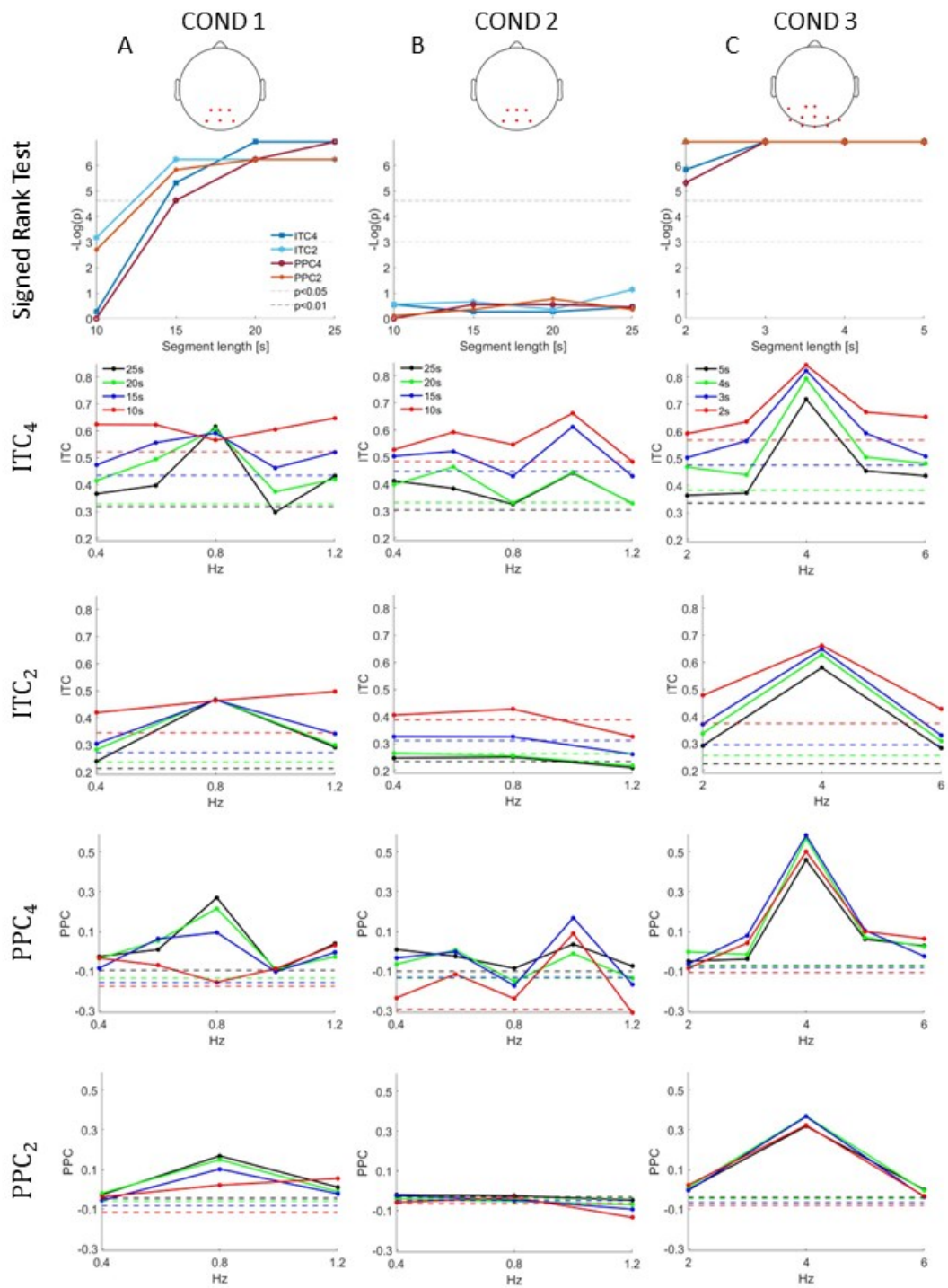


Figura 4.5 – Prima riga: visualizzazione del cluster significativo ottenuto dalla conjunction analysis con rispettivo wilcoxon signed rank test in tutte e tre le condizioni. Dalla seconda riga in poi: visualizzazione della sovrapposizione delle lunghezze di segnale considerate, per ogni misura di fase in ogni condizione. Le linee tratteggiate corrispondono alla media dei surrogate.

5. DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi presenta un'analisi metodologica per valutare quale misura sia più efficace e robusta nel rilevare una risposta neurale affidabile in un periodo di registrazione limitato e ad una frequenza di stimolazione molto bassa. I risultati hanno suggerito come 15 secondi di segnale con una stimolazione a 0.8 Hz siano sufficienti ad avere una significatività statistica per tutte le misure utilizzate, sia quelle basate sulla potenza, sia quelle basate sulla fase. Per il caso critico di 8 cicli di stimolazione invece, il power spectrum risulta l'unica misura affidabile e quindi utilizzabile.

Le prime analisi sul segmento di segnale più lungo, 25 secondi per la risonanza a 0.8 Hz e 5 secondi per la risonanza a 4 Hz, situazione considerata come nostro *ground truth*, hanno mostrato una forte attivazione della corteccia visiva rilevata dagli elettrodi. La maggior parte dei 64 elettrodi utilizzati nella cuffia EEG risulta essere statisticamente significativa, con una predominanza dell'effetto nella regione occipitale (topografie prima e terza colonna Fig.4.1; topografie prima e terza colonna Fig.4.4). Questi risultati si sono rivelati in linea con le nostre ipotesi iniziali dal momento che è proprio il lobo occipitale quello preposto all'elaborazione delle funzioni visive.

Le misure utilizzate in entrambe le condizioni di risonanza per il caso del *ground truth* sono robuste come è possibile vedere dai grafici della prima e terza colonna di Fig.4.1 e Fig.4.4. Inoltre, dai risultati ottenuti al diminuire della lunghezza di segnale a disposizione è semplice notare come ITC subisce un crollo di significatività portandoci alla conclusione che non è la misura adatta da utilizzare nelle nostre condizioni critiche di interesse. In effetti, basandosi questa misura sulla fase, risulta molto complicato riuscire ad avere una coerenza con solo due finestre a disposizione per il calcolo e quindi solo due

campioni per costruire la distribuzione delle fasi. Le misure di potenza invece, non avendo questo problema, risultano essere le migliori. Le analisi svolte soggetto per soggetto confermano i risultati ottenuti. Per entrambe le condizioni di risonanza, nel caso di maggior quantità di segnale, si può notare come le due misure siano significative per tutti e 11 i soggetti (Fig.4.3A; Fig.4.3C prima riga). Nel caso critico invece, per la risonanza a 0.8Hz, il power spectrum subisce un'inversione solamente per il soggetto 9 mentre ITC presenta 5 soggetti su 11 in cui il rumore di fondo prevale sul segnale (Fig.4.3A seconda riga). Questa analisi risulta utile poiché mette in luce come sia possibile andare a valutare la risposta neurale attraverso il power spectrum anche soggetto per soggetto.

Questi risultati sono compatibili e in un certo senso confermano, ad esempio, la bontà della scelta di Kabdebon e colleghi di utilizzare l'ITC nel loro studio basato sull'apprendimento della parola (Kabdebon et al., 2015). Loro, infatti, disponevano di una grande quantità di segnale (100 secondi circa di registrazione) segmentato in epoche non sovrapposte di 8.652 secondi l'una. Il numero di epoche è di gran lunga superiore al nostro caso di ground truth, situazione per la quale ITC risulta già affidabile. Stesso discorso vale per lo studio di Henin e colleghi (Henin et al., 2021). In questo caso addirittura avevano a disposizione 10 minuti di registrazione e un numero di epoche conseguente molto abbondante. Per quanto riguarda invece l'utilizzo di misure di potenza, uno dei più recenti studi nelle condizioni di nostro interesse è quello di Buiatti e colleghi (Buiatti et al., 2019). In questo caso è stato scelto di utilizzare il power spectrum come misura per l'analisi dei dati. Loro avevano a disposizione una quantità di segnale molto limitata acquisita a bassa frequenza di stimolazione (0.8 Hz) in cui per qualche soggetto e condizione era presente solo un segmento di 10 secondi. Scelta quindi anche in questo caso compatibile con i nostri risultati. In ogni caso, per effettuare un ulteriore e

definitiva verifica di questi risultati, prevediamo in futuro di testare le stesse metodologie utilizzate in questa tesi su dati di neonati.

6. CONCLUSIONI

In questo studio, abbiamo voluto investigare quale fosse la metodologia migliore per l'analisi del segnale EEG acquisito in soggetti adulti attraverso un paradigma frequency tagging in condizioni critiche favorevoli alla popolazione dei neonati: frequenza di acquisizione molto bassa e scarsa quantità di segnale a disposizione. Abbiamo così osservato diversi aspetti.

Innanzitutto, abbiamo confermato la bontà del frequency tagging come paradigma sperimentale per l'acquisizione del segnale. Ciò era già stato appurato dalla notevole quantità di studi presenti in letteratura in adulti e soprattutto bambini e neonati. Diversi studi a scopo di ricerca scientifica sono stati fatti in popolazioni di età infantile. Per citarne alcuni, ad esempio, sull'acuità visiva (Sokol et al., 1988; Allen et al., 1992; Polevoy et al., 2017), sulla discriminazione di volti (Buiatti et al., 2019; Barry-Anwar et al., 2018), sull'attenzione in una scena visiva in bambini di tre mesi (Roberston et al., 2012), sulla valutazione dell'influenza dello stato di eccitazione del soggetto durante l'acquisizione del segnale (Cohen et al., 1991).

In secondo luogo, siamo in grado di affermare che nel caso in cui si abbia a disposizione un segmento di segnale di 15 secondi di lunghezza, esso è sufficiente ad avere una significatività statistica sia per le misure basate sulla potenza sia per le misure basate sulla fase al fine di una buona rilevazione dell'attività cerebrale indipendentemente dalla frequenza di stimolazione con una lieve preferenza per PS8, EPS4 e ITC4.

I nostri risultati hanno evidenziato come, per il caso critico di 10 secondi di segnale con una frequenza di stimolazione molto bassa pari a 0.8 Hz, il power spectrum rimanga l'unica misura significativa ed utilizzabile, mentre evoked power spectrum e ITC

subiscono un crollo netto della significatività. La risposta allo stimolo non è più così marcata rispetto al rumore di fondo, fattore che rende poco affidabili in questa condizione le due misure.

Per concludere quindi possiamo affermare che i nostri dati suggeriscono come il power spectrum risulti essere la misura più costante in termini di affidabilità al variare delle condizioni e quella da utilizzare nel caso in cui si vogliano svolgere studi con una stimolazione a basse frequenze e le circostanze portino ad avere a disposizione una quantità di segnale molto bassa.

BIBLIOGRAFIA

Ahlfors, S. P., Han, J., Belliveau, J. W., & Hämäläinen, M. S. (2010). Sensitivity of MEG and EEG to source orientation. *Brain topography*, 23(3), 227-232.

Allen, D., Bennett, P. J., & Banks, M. S. (1992). The effects of luminance on FPL and VEP acuity in human infants. *Vision research*, 32(11), 2005-2012.

Aydore, S., Pantazis, D., & Leahy, R. M. (2013). A note on the phase locking value and its properties. *Neuroimage*, 74, 231-244.

Barry-Anwar, R., Hadley, H., Conte, S., Keil, A., & Scott, L. S. (2018). The developmental time course and topographic distribution of individual-level monkey face discrimination in the infant brain. *Neuropsychologia*, 108, 25-31.

Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2007). Terza edizione italiana a cura di Casco, C., Petrosini, L., Oliveri, M. *Neuroscienze. Esplorando il cervello*. Elsevier.

Buiatti, M., Peña, M., & Dehaene-Lambertz, G. (2009). Investigating the neural correlates of continuous speech computation with frequency-tagged neuroelectric responses. *Neuroimage*, 44(2), 509-519.

Buiatti, M., Di Giorgio, E., Piazza, M., Polloni, C., Menna, G., Taddei, F., Baldo, E., & Vallortigara, G. (2019). Cortical route for facelike pattern processing in human newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4625-4630.

Cohen, L. T., Rickards, F. W., & Clark, G. M. (1991). A comparison of steady-state evoked potentials to modulated tones in awake and sleeping humans. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 90(5), 2467-2479.

Cohen, M. X. (2014). *Analyzing neural time series data: theory and practice*. MIT press, Cambridge.

De Heering, A., & Rossion, B. (2015). Rapid categorization of natural face images in the infant right hemisphere. *Elife*, 4, e06564.

Delorme, A., & Makeig, S. (2004). EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of neuroscience methods*, 134(1), 9-21.

Farzin, F., Hou, C., & Norcia, A. M. (2012). Piecing it together: infants' neural responses to face and object structure. *Journal of Vision*, 12(13), 6-6.

Galambos, R., Makeig, S., & Talmachoff, P. J. (1981). A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp. *Proceedings of the national academy of sciences*, 78(4), 2643-2647.

Gyulai, A., Körmendi, J., Juhasz, Z., & Nagy, Z. (2021). Inter trial coherence of low-frequency oscillations in the course of stroke recovery. *Clinical Neurophysiology*, 132(10), 2447-2455.

Henin, S., Turk-Browne, N. B., Friedman, D., Liu, A., Dugan, P., Flinker, A., ... & Melloni, L. (2021). Learning hierarchical sequence representations across human cortex and hippocampus. *Science advances*, 7(8), eabc4530.

Holmes, G. L., & Khazipov, R. (2007). Basic neurophysiology and the cortical basis of EEG. *The clinical neurophysiology primer*, 19-33.

Jackson, A. F., & Bolger, D. J. (2014). The neurophysiological bases of EEG and EEG measurement: A review for the rest of us. *Psychophysiology*, 51(11), 1061-1071.

Joon Kim, Y., Grabowecky, M., Paller, K. A., Muthu, K., & Suzuki, S. (2007). Attention induces synchronization-based response gain in steady-state visual evoked potentials. *Nature neuroscience*, 10(1), 117-125.

Kabdebon, C., & Dehaene-Lambertz, G. (2019). Symbolic labeling in 5-month-old human infants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(12), 5805-5810.

Klem, G. H. (1999). The ten-twenty electrode system of the international federation. the international federation of clinical neurophysiology. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.*, *52*, 3-6.

Kuwada, S., Batra, R., & Maher, V. L. (1986). Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones. *Hearing research*, *21*(2), 179-192.

Lachaux, J. P., Rodriguez, E., Martinerie, J., & Varela, F. J. (1999). Measuring phase synchrony in brain signals. *Human brain mapping*, *8*(4), 194-208.

Leleu, A., Rekow, D., Poncet, F., Schaal, B., Durand, K., Rossion, B., & Baudouin, J. Y. (2020). Maternal odor shapes rapid face categorization in the infant brain. *Developmental Science*, *23*(2), e12877.

Makeig, S., Debener, S., Onton, J., & Delorme, A. (2004). Mining event-related brain dynamics. *Trends in cognitive sciences*, *8*(5), 204-210.

Mognon, A., Jovicich, J., Bruzzone, L., & Buiatti, M. (2011). ADJUST: An automatic EEG artifact detector based on the joint use of spatial and temporal features. *Psychophysiology*, *48*(2), 229-240.

Montagna, F., Buiatti, M., Benatti, S., Rossi, D., Farella, E., & Benini, L. (2017). A machine learning approach for automated wide-range frequency tagging analysis in embedded neuromonitoring systems. *Methods*, *129*, 96-107.

Nash-Kille, A., & Sharma, A. (2014). Inter-trial coherence as a marker of cortical phase synchrony in children with sensorineural hearing loss and auditory neuropathy spectrum disorder fitted with hearing aids and cochlear implants. *Clinical Neurophysiology*, *125*(7), 1459-1470.

Niedermeyer, E., & da Silva, F. L. (Eds.). (2005). *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*. Lippincott Williams & Wilkins.

Norcia, A. M., & Tyler, C. W. (1985). Infant VEP acuity measurements: analysis of individual differences and measurement error. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *61*(5), 359-369.

Norcia, A. M., Appelbaum, L. G., Ales, J. M., Cottureau, B. R., & Rossion, B. (2015). The steady-state visual evoked potential in vision research: A review. *Journal of vision*, *15*(6), 4-4.

Nunez, P. L., & Srinivasan, R. (2006). *Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG*. Oxford University Press, USA.

Oostenveld, R., Fries, P., Maris, E., & Schoffelen, J. M. (2011). FieldTrip: open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Computational intelligence and neuroscience*, *2011*.

Percival, D. B., & Walden, A. T. (1993). *Spectral analysis for physical applications*. cambridge university press.

Polevoy, C., Muckle, G., Séguin, J. R., Ouellet, E., & Saint-Amour, D. (2017). Similarities and differences between behavioral and electrophysiological visual acuity thresholds in healthy infants during the second half of the first year of life. *Documenta ophthalmologica*, *134*(2), 99-110.

Regan, D. (1965). A study of the visual system by the correlation of light stimuli and evoked electrical responses.

Regan, D (1989). *Human Brain Electrophysiology: Evoked Potentials and Evoked Magnetic Fields in Science and Medicine*, Elsevier.

Regan, M. P., & Regan, D. (1989). Objective investigation of visual function using a nondestructive zoom-FFT technique for evoked potential analysis. *Canadian journal of neurological sciences*, *16*(2), 168-179.

Rekow, D., Baudouin, J. Y., Poncet, F., Damon, F., Durand, K., Schaal, B., Rossion, B., & Leleu, A. (2021). Odor-driven face-like categorization in the human infant brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(21).

Rickards, F. W., & Clark, G. M. (1982). Steady state evoked potentials to amplitude modulated tones. *Butterworths*.

Robertson, S. S., Watamura, S. E., & Wilbourn, M. P. (2012). Attentional dynamics of infant visual foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(28), 11460-11464.

Scheff, S. W. (2016). *Fundamental statistical principles for the neurobiologist: a survival guide*. Academic Press.

Seeck, M., Koessler, L., Bast, T., Leijten, F., Michel, C., Baumgartner, C., He, B. & Beniczky, S. (2017). The standardized EEG electrode array of the IFCN. *Clinical Neurophysiology*, *128*(10), 2070-2077.

Sokol, S., Moskowitz, A., McCormack, G., & Augliere, R. (1988). Infant grating acuity is temporally tuned. *Vision Research*, *28*(12), 1357-1366.

Subha, D. P., Joseph, P. K., Acharya U, R., & Lim, C. M. (2010). EEG signal analysis: a survey. *Journal of medical systems*, 34(2), 195-212.

Thompson, T., Steffert, T., Ros, T., Leach, J., & Gruzelier, J. (2008). EEG applications for sport and performance. *Methods*, 45(4), 279-288.

Vinck, M., van Wingerden, M., Womelsdorf, T., Fries, P., & Pennartz, C. M. (2010). The pairwise phase consistency: a bias-free measure of rhythmic neuronal synchronization. *Neuroimage*, 51(1), 112-122.

Whittingstall, K., Stroink, G., Gates, L., Connolly, J. F., & Finley, A. (2003). Effects of dipole position, orientation and noise on the accuracy of EEG source localization. *Biomedical engineering online*, 2(1), 1-5.

Wolpaw, J. R. (2004). Brain-computer interfaces (BCIs) for communication and control: a mini-review. *Supplements to Clinical neurophysiology*, 57, 607-613.

Yu, L., Wang, S., Huang, D., Wu, X., & Zhang, Y. (2018). Role of inter-trial phase coherence in atypical auditory evoked potentials to speech and nonspeech stimuli in children with autism. *Clinical Neurophysiology*, 129(7), 1374-1382.

Zurek, P. M. (1992). Detectability of transient and sinusoidal otoacoustic emissions. *Ear and hearing*, 13(5), 307-310.