

Carlos Sato Baraldi Dias

***Dissertação de Mestrado:***  
***Estudo da viabilidade da utilização da técnica de***  
***MRS in vivo em experimentos funcionais***

Este exemplar corresponde à redação final da  
Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno  
Carlos Sato Baraldi Dias e aprovada pela  
Comissão Julgadora

Orientadora:  
Profa. Dra. Gabriela Castellano



45/06/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
UNICAMP

Campinas – SP

Março / 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

D543e      Dias, Carlos Sato Baraldi  
Estudo da viabilidade da utilização da técnica de MRS in vivo em experimentos funcionais / Carlos Sato Baraldi Dias. – Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Gabriela Castellano.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Ressonância magnética funcional. 2. Espectroscopia de ressonância magnética. 3. Cérebro – Metabolismo.  
I. Castellano, Gabriela. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

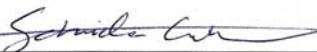
(vsv/ifgw)

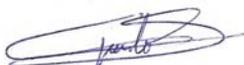
- **Título em inglês:** Feasibility study of in vivo MRS for functional experiments
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
  1. Functional magnetic resonance
  2. Magnetic resonance spectroscopy
  3. Cerebral metabolism
- **Área de Concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em Física
- **Banca Examinadora:**  
Profª Gabriela Castellano  
Prof. Carlos Ernesto Garrido Salmón  
Prof. Roberto José Maria Covolan
- **Data da Defesa:** 15-04-2010
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física

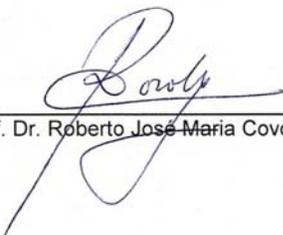


MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE **CARLOS SATO BARALDI DIAS – RA 023341** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 15 / 04 / 2010.

**COMISSÃO JULGADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Gabriela Castellano - Orientadora do Candidato  
DRCC/IFGW/UNICAMP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Ernesto Garrido Salmón – DFM/FFCLRP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan - DRCC/IFGW/UNICAMP

---

## *Agradecimentos*

Quero começar agradecendo a minha família. Primeiro aos meus pais, Carlos e Mitsue, que me apoiaram em todas as minhas decisões e fizeram com que eu me tornasse o que sou hoje. Obrigado pela confiança, principalmente nos meus momentos de fraqueza; obrigado pelo carinho, que mesmo longe o carregou comigo; mas principalmente, obrigado por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço a minha irmã, Mariane, que em suas idas e vindas a Campinas sempre se mostrou disposta em me alegrar e conversar. Agradeço a minha tia Mú que além de me acolher em sua casa sempre me recebeu com um grande e carinhoso abraço. Agradeço a minha madrinha Carmem, que hoje a que tenho como vó, pelo carinho durante os nossos lanches. Também não posso deixar de agradecer a uma outra família, uma que tive a sorte de encontrar quando este trabalho ainda estava começando e esteve sempre do meu lado: agradeço a minha namorada Juliana, que em vários momentos escutou meus problemas e sempre trouxe a alegria que eu precisava para continuar.

Sou grato a minha orientadora que desde a minha graduação vem me ensinando não só como ser um Físico, mas também como ser uma pessoa melhor, sempre terei comigo suas lições de professora, orientadora e amiga acumuladas nestes anos de trabalho em conjunto. Além dela também agradeço ao Professor Covolan que com muita paciência colaborou não só com seu conhecimento mas também com sua experiência. Também quero agradecer a outros professores como o professor Fernando Cerdeira, Ernesto Kemp, Carlos Giles, Sérgio Querino Brunetto e muitos outros, que ajudaram, das mais diversas formas, na realização deste trabalho.

Agradeço também aos funcionários do Departamento de Raios Cósmicos pelo suporte obtido, assim como a todos que compõem os Laboratórios de Léptons e o de Cristalografia Aplicada de Raio-X que me acolheram.

Agradeço a meus amigos Imara Fernandes, Guilherme Beltramini, Larissa Veiga, Bruno Miguez e Thiago Bezzera que em diversas ocasiões forneceram o apoio necessário para superação dos obstáculos ao longo do trabalho. E agradeço também aos amigos José Renato Mardegan e Luis Fernando Gonzalez que sempre me ajudaram nos problemas da faculdade e em inúmeros fora dela.

Agradeço a CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro durante todo o projeto de mestrado.



## *Resumo*

A técnica de espectroscopia por ressonância magnética (MRS, do inglês Magnetic Resonance Spectroscopy) baseada no núcleo do hidrogênio ( $^1H$ -MRS) tem sido muito usada em estudos neurológicos na determinação de padrões metabólicos para várias patologias. A informação fornecida por esta técnica é única, pois permite monitorar níveis de metabólitos específicos, envolvidos em vários aspectos da função cerebral. Até o momento, a grande maioria dos estudos de  $^1H$ -MRS *in vivo* têm sido “estáticos”, no sentido de que uma única medida é feita, sem se preocupar com informação temporal. Isso se deve à baixa razão sinal-ruído inerente a esta técnica, que obriga à realização de aquisições longas e médias temporais, sacrificando a resolução temporal. No entanto, o advento da técnica de ressonância magnética funcional e de outras técnicas de neuroimagem dinâmicas, que medem parâmetros dinâmicos como fluxo sanguíneo, taxa de oxigenação do sangue, atividades elétrica e magnética do cérebro, naturalmente fez surgir o interesse em se ter uma técnica que pudesse fornecer informação dinâmica sobre as vias metabólicas associadas à função cerebral - uma MRS funcional. O objetivo deste trabalho foi, portanto, verificar a viabilidade da utilização da técnica de MRS *in vivo* em experimentos funcionais, tendo sido o primeiro realizado nesta área, no Brasil. Para isso foi primeiramente realizado um estudo extensivo sobre os poucos trabalhos existentes na área e as bases bioquímicas da ativação neuronal. Em seguida, foram realizados experimentos e desenvolvidos vários métodos de análise para tentar detectar a variação temporal dos principais metabólitos presentes num espectro cerebral (N-acetil-aspartato total: NAA, Creatina total: Cre, grupo Colina: Cho, grupo Glutamato/Glutamina: Glx, e Lactato: Lac) em indivíduos saudáveis, durante um experimento com estímulo visual. Os experimentos apresentaram uma série de dificuldades, e não foi possível alcançar a alta resolução temporal desejada, sendo que a resolução média ficou na ordem de minutos - o que concorda, no entanto, com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura. Não detectamos variações significativas nos níveis de NAA, Cre e Cho, o que também está de acordo com a maioria dos estudos encontrados na literatura. Por outro lado, foram encontradas variações nos níveis de Lac (que aumentaram com o estímulo, o que concorda com a literatura, porém não voltaram ao nível basal após o estímulo, o que não concorda), e variações nos níveis do grupo Glx (que aumentaram com o estímulo, voltando em seguida ao nível basal, o que concorda com a literatura). Embora os resultados encontrados não tenham sido totalmente concordantes com a literatura e não tenha sido possível melhorar a resolução temporal (em relação aos trabalhos da literatura), acreditamos que este trabalho deixa uma significativa contribuição através dos diversos protocolos experimentais e métodos de análise testados, e abre o caminho para pesquisas futuras na área.



## *Abstract*

The technique of Magnetic Resonance Spectroscopy using the hydrogen nucleus ( $^1H$ -MRS) has been widely used for neurologic research for determining metabolic patterns for many pathologies. The type of information provided by this technique is unique, since it allows monitoring specific metabolic concentrations involved in cerebral function. Until now, the majority of the *in vivo*  $^1H$ -MRS studies have been “static”, meaning that data acquisition is done with no concern for temporal information. The reason for this is the low signal-to-noise ratio (SNR) inherent to this technique, which imposes long acquisitions and time averaging that sacrifices temporal resolution. However, the development of function Magnetic Resonance Imaging (fMRI) and other time resolved neuroimaging techniques, that measure dynamic parameters such as blood flow, blood oxygenation rate, electric and magnetic cerebral activity, naturally brought up the interest on a technique that would allow a time resolved measure of the specific metabolic concentrations involved on cerebral metabolism - something like a functional MRS. Therefore the goal of this work was to study the feasibility of using the *in vivo* MRS technique for functional experiments, being the first of its kind performed in Brazil. To do so, initially an extensive bibliographic research was done, to comprehend not only the details of these experiments but also the neurochemistry behind the MRS signal. Next, experiments were performed and many analysis methods were developed, in order to attempt to detect temporal variations of the main metabolites present on a typical cerebral spectrum (total N-acetyl-aspartic acid: NAA, total Creatine: Cre, total Choline: Cho, Glutamine/Glutamate group: Glx and Lactate: Lac) in healthy subjects, during a visual stimulation experiment. Those experiments presented a series of difficulties and the desired high temporal resolution was not attained, achieving an average resolution of minutes - the same resolution found on the majority of the works published. We did not detect any significant variation of the NAA, Cre or Cho levels, which supports the conclusions of other works published. On the other hand, we detected variations in the Lactate levels (which increased with the stimulus, as reported in other works, but did not return to baseline levels, which disagrees with the published works), and in the Glx levels (which increased with the stimulus, returning to baseline levels after it, which agrees with the published literature). Although the results found are not totally in agreement with the published literature and it was not possible to improve the temporal resolution (compared to published works), we believe that this work leaves a significant contribution to the field, through the experimental protocols and analysis methods tested, and opens paths for future research in this area.



# Sumário

<b>Símbolos usados neste trabalho</b>	p. xv
<b>Abreviaturas usadas neste trabalho</b>	p. xvii
<b>Lista de Figuras</b>	p. xix
<b>Lista de Tabelas</b>	p. xxiii
<b>Introdução</b>	p. 1
<b>1 Fundamentos</b>	p. 3
1.1 Ressonância Magnética Nuclear (NMR) . . . . .	p. 3
1.1.1 Excitação e Detecção . . . . .	p. 6
1.2 Sobre experimentos <i>in vivo</i> . . . . .	p. 9
1.2.1 Sequências de pulso . . . . .	p. 9
1.2.2 Fontes de erro . . . . .	p. 11
1.2.3 Volume de interesse . . . . .	p. 14
1.2.4 Efeito BOLD . . . . .	p. 16
1.2.5 Quantificação de metabólitos . . . . .	p. 16
1.2.6 Concentrações absolutas versus concentrações relativas . . . . .	p. 18
<b>2 Revisão da literatura</b>	p. 19
2.1 <i>Functional Magnetic Resonance Spectroscopy</i> . . . . .	p. 21
2.1.1 Abordagens experimentais . . . . .	p. 26
2.1.2 Dos artigos estudados . . . . .	p. 27

2.1.3	Comentários finais . . . . .	p. 31
2.2	Bioquímica Neuronal . . . . .	p. 32
2.2.1	O modelo <i>Astrocyte to Neuron Lactate shuttle</i> (ANLS) . . . . .	p. 32
2.2.2	Experimentos . . . . .	p. 35
2.2.3	Simulações . . . . .	p. 36
2.3	Conclusões . . . . .	p. 44
<b>3</b>	<b>Experimentos realizados</b>	<b>p. 47</b>
3.1	Protocolos de aquisição e paradigma . . . . .	p. 47
3.1.1	Hardware . . . . .	p. 47
3.1.2	Sequência de pulsos . . . . .	p. 47
3.1.3	NSA e phase-cycling . . . . .	p. 48
3.1.4	Estímulo e volume de interesse . . . . .	p. 49
3.1.5	Paradigmas . . . . .	p. 49
3.2	Aquisição . . . . .	p. 50
3.3	Pós-processamento . . . . .	p. 55
3.3.1	Leitura dos dados e aplicação dos paradigmas . . . . .	p. 55
3.3.2	Ferramentas de processamento . . . . .	p. 55
3.3.3	Formato dos dados . . . . .	p. 56
3.3.4	Quantificação . . . . .	p. 56
3.4	Experimentos realizados . . . . .	p. 57
3.4.1	Experimento Curto . . . . .	p. 57
3.4.2	Experimento Longo . . . . .	p. 58
3.4.3	Experimento Longo Modificado . . . . .	p. 59
<b>4</b>	<b>Análise e resultados</b>	<b>p. 61</b>
4.1	Experimento Curto . . . . .	p. 61

4.2	Experimento Longo . . . . .	p. 64
4.3	Experimento Longo Modificado . . . . .	p. 71
4.4	Análises complementares . . . . .	p. 72
4.4.1	Análise sobre o uso ou não de ECC . . . . .	p. 72
4.4.2	Análise média pré-quantificação . . . . .	p. 76
<b>5</b>	<b>Conclusões finais</b>	p. 83
	<b>Referências Bibliográficas</b>	p. 85
	<b>Apêndice A – Termo de consentimento livre esclarecido</b>	p. 91
	<b>Apêndice B – Questionário para controles</b>	p. 95



## *Símbolos usados neste trabalho*

$\gamma$	constante giromagnética
$\hbar$	Constante de Planck reduzida ou Constante de Dirac
<i>ATP</i>	adenosinatrifosfato
<i>B</i>	Campo Magnético
<i>Cho</i>	Glicerofosfocolina + Fosfocolina
<i>Cre</i>	Creatina + Fosfocreatina
<i>Gln</i>	Glutamina
<i>Glu</i>	Glutamato
<i>Glx</i>	Grupo Glutamato/Glutamina
<i>L</i>	Momento Angular
<i>Lac</i>	Lactato
<i>NAA</i>	N-acetil-aspartato + ácido N-acetilglutâmico
$T_1$	tempo de relaxação spin-lattice
$T_2$	tempo de relaxação spin-spin



## *Abreviaturas usadas neste trabalho*

AMARES	Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data
ANLS	Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle
BOLD	Blood-Oxygen-Level Dependent
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHESS	Chemical-Shift-Selective
CInPCe	Coordenação Interinstitucional para Apoio a Pesquisa Sobre o Cérebro
CRLB	Cramér-Rao lower bound
CSI	Chemical Shift Imaging
CT	Computer Tomography
ECC	Eddy Currents Correction
EEG	Eletroencefalografia
FID	Free Induction Decay
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging
fMRS	functional Magnetic Resonance Spectroscopy
LCModel	Linear Combination of Model in vitro spectra
MEG	Magnetic Encefalography
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
MRSI	Imagem de Espectroscopia por Ressonância Magnética (Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging)
NIR-DOT	Near Infrared - Diffuse Optical Tomography
NSA	Number of Spectral Averages
PRESS	Point Resolved Spectroscopy
QUEST	quantitation based on QUantum ESTimation
RF	Radio Frequência
SNR	Singt to Noise Ratio

STE	Stimulated Echo
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
SVS	Espectroscopia de Voxel Único (Single Voxel Spectroscopy)
VOI	Volume de Interesse (Volume of Interest)

# *Lista de Figuras*

1.1	Representação dos spins e da magnetização. . . . .	p. 5
1.2	Dinâmica dos spins quando em ressonância. . . . .	p. 6
1.3	Trajetória de $\vec{M}$ durante o relaxamento. . . . .	p. 7
1.4	FID no espaço de Fourier: espectro. . . . .	p. 8
1.5	Exemplo de espectro <i>in vivo</i> . . . . .	p. 8
1.6	Sequências de pulso para aquisição espectroscópica. . . . .	p. 10
1.7	Escolha do VOI utilizando gradientes. . . . .	p. 11
1.8	Técnicas de aquisição para localização na MRS. . . . .	p. 15
2.1	Compartimentos para simulação feita em (SIMPSON; CARRUTHERS; VAN-NUCCI, 2007). . . . .	p. 36
2.2	Representação das posições dos transportadores metabólicos ao longo da membrana celular. . . . .	p. 37
2.3	Ajuste da simulação a dados encontrados na literatura. . . . .	p. 37
2.4	Resultados da simulação sem a hipótese <i>ANLS</i> . . . . .	p. 38
2.5	Ajuste da simulação impondo a hipótese <i>ANLS</i> . . . . .	p. 39
2.6	Resultados da simulação com a hipótese <i>ANLS</i> . . . . .	p. 40
2.7	Representação para simulação feita em (AUBERT et al., 2007). . . . .	p. 41
2.8	Ajuste da simulação a dados da literatura. . . . .	p. 43
2.9	Ajuste da simulação a dados da literatura. . . . .	p. 43
2.10	Resultados da simulação. . . . .	p. 43
2.11	Resultados da simulação. . . . .	p. 44
2.12	Resultados da simulação com a hipótese <i>ANLS</i> . . . . .	p. 45

3.1	Bobina <i>Headcoil</i> . . . . .	p. 47
3.2	Comparação entre espectros obtidos com PRESS e STEAM. . . . .	p. 48
3.3	Imagem utilizada com estímulo visual. . . . .	p. 49
3.4	Paradigmas utilizados no trabalho. . . . .	p. 50
3.5	Sistema para aquisição de fMRS. . . . .	p. 51
3.6	Posicionamento de indivíduo. . . . .	p. 52
3.7	Exemplos de aquisição para avaliação da SNR . . . . .	p. 53
3.8	Imagens obtidas durante as aquisições de referência e preparação . . . . .	p. 54
3.9	Posicionamento do voxel utilizado nos Experimentos Curto e Longo. . . . .	p. 58
3.10	Phantom1 . . . . .	p. 58
3.11	Phantom CInAPCe . . . . .	p. 59
3.12	Posicionamento do voxel utilizado no Experimentos Longo Modificado. . . . .	p. 60
4.1	Esquema da análise ONvsOFF_Blocos do Experimento Curto. . . . .	p. 61
4.2	Análise ONvsOFF_Blocos dos metabólitos medidos no Experimento Curto. . . . .	p. 62
4.3	Esquema da análise ONvsOFF_Total do Experimento Curto. . . . .	p. 63
4.4	Análise ONvsOFF_Total do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Curto. . . . .	p. 63
4.5	Esquema da análise Janela10 do Experimento Longo. . . . .	p. 65
4.6	Análise Janela10 do grupo Colina medido no Experimento Longo. . . . .	p. 65
4.7	Análise Janela10 da Creatina total medida no Experimento Longo. . . . .	p. 66
4.8	Análise Janela10 do NAA total medido no Experimento Longo. . . . .	p. 67
4.9	Esquema da análise Grupo20 do Experimento Longo. . . . .	p. 68
4.10	Análise Grupo20 do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo. . . . .	p. 68
4.11	Análise Grupo20 do grupo Colina medido no Experimento Longo. . . . .	p. 69
4.12	Análise Grupo20 da Creatina total medida no Experimento Longo. . . . .	p. 69
4.13	Análise Grupo20 do NAA total medido no Experimento Longo. . . . .	p. 70

4.14	Esquema da análise BaselineOnOff do Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 71
4.15	Análise BaselineOnOff do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 72
4.16	Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 73
4.17	Análise BaselineOnOff da Creatina total medida no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 73
4.18	Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 74
4.19	Análise BaselineOnOff da Creatina total medida no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 75
4.20	Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 75
4.21	Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 76
4.22	Ajuste e resíduo calculados pelo LCModel utilizando o ECC: Em vermelho o ajuste encontrado, e na porção superior o resíduo encontrado. Notar que o destaque azul mostra o pico do grupo Colina que não foi ajustado e resultou em um resíduo elevado. . . . .	p. 77
4.23	Análise BaselineOnOff do Lactato medido no Experimento Longo Modificado.	p. 78
4.24	Análise BaselineOnOff do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 79
4.25	Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 80
4.26	Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 80
4.27	Análise BaselineOnOff da Creatina total medida no Experimento Longo Modificado. . . . .	p. 81



## *Lista de Tabelas*

2.1	Sumário de parâmetros utilizados nos artigos revisados de fMRS. . . . .	p. 23
2.2	Sumário de parâmetros utilizados nos artigos revisados de fMRS (continuação da Tabela 2.1) . . . . .	p. 24
2.3	Sumário dos principais resultados alcançados nos artigos revisados de fMRS dos últimos 10 anos. . . . .	p. 25
3.1	Concentrações molares do Phantom1, fabricado em 19/10/2009 . . . . .	p. 59
3.2	Concentrações molares do Phantom CInAPCe, fabricado em 25/11/2009 . . .	p. 60



## *Introdução*

A espectroscopia por ressonância magnética (MRS, do inglês *Magnetic Resonance Spectroscopy*) é uma técnica que permite a análise do conteúdo químico de uma amostra de forma não-invasiva, quantificando metabólitos específicos passíveis de serem detectados pela técnica. Em anos recentes, muito esforço tem sido colocado no sentido de tornar possível a utilização desta técnica no ambiente clínico, de forma a complementar a informação fornecida por exames diagnósticos mais comuns, como as imagens por ressonância magnética (MRI) ou por tomografia computadorizada de raios-x (CT). Em particular, a MRS baseada no núcleo do hidrogênio ( $^1H$ -MRS) tem sido muito usada em estudos neurológicos na determinação de padrões metabólicos para várias patologias, entre elas diversos tipos de tumores cerebrais (MAJÓs et al., 2003), Alzheimer, epilepsia (CENDES et al., 1997),(CENDES, 2003),(LI et al., 2000), hipóxia (CHEONG et al., 2006), Canavan (GALANAUD et al., 2007), entre outras.

Isso se deve em parte a que o  $^1H$  é o núcleo usado para fazer as imagens, o que permite que o mesmo equipamento de MRI seja usado para MRS; em parte devido à alta sensibilidade deste núcleo; e em parte devido aos metabólitos específicos que podem ser detectados via  $^1H$ -MRS, como o N-acetil-aspartato (NAA), considerado um marcador neuronal; o Glutamato, que é o principal neurotransmissor; e Lactato, associado ao metabolismo neuronal subjacente a uma ativação.

No entanto, a MRS aplicada *in vivo* é uma técnica que apresenta uma série de problemas: os campos magnéticos de baixa para média intensidade (1-3 Tesla) usados em aplicações clínicas, juntamente com as baixas concentrações dos metabólitos estudados presentes no corpo humano, resultam numa baixa razão sinal-ruído (SNR); a impossibilidade de controlar a temperatura da amostra (indivíduo) resulta em deslocamentos químicos deslocados do valor esperado; as inhomogeneidades de campo, que aparecem devido a uma série de diferentes fatores (como as correntes induzidas), contribuem para a incerteza da medida; em  $^1H$ -MRS, os sinais residuais da água e gorduras modificam a linha de base. Todos estes problemas se combinam resultando em um sinal de MRS medido de baixa SNR. Este problema é contornado por aquisições onde vários espectros (centenas) são adquiridos, e o espectro médio resultante é utilizado para a análise. Ou seja, resolução temporal é trocada por alta SNR.

Por outro lado, com o advento da técnica de ressonância magnética funcional (fMRI) e de outras técnicas de neuroimagem dinâmicas (como fMRI e eletroencefalografia (EEG) combinados, tomografia óptica de difusão no infra-vermelho próximo (NIR-DOT), magnetoencefalografia (MEG)), que medem parâmetros dinâmicos como o fluxo sanguíneo, a taxa de oxigenação do sangue, as atividades elétrica e magnética, etc., tem surgido cada vez mais interesse em se ter técnicas que possam fornecer informação dinâmica sobre os caminhos metabólicos da função cerebral. No entanto, o monitoramento de níveis metabólicos *in vivo* durante uma ativação neuronal via MRS, denominado fMRS (do inglês *functional Magnetic Resonance Spectroscopy*), ainda é uma área relativamente nova na literatura. O principal problema com a aplicação desta técnica de forma dinâmica é sua baixa SNR, já mencionada. Os poucos trabalhos que objetivam a monitoração dinâmica dos níveis metabólicos têm, portanto, seguido abordagens que permitam contornar essa baixa SNR inerente.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver experimentos com a finalidade de estudar a viabilidade da técnica de fMRS, sendo o primeiro com tal propósito no Brasil. Este projeto está inserido no Programa CInAPCe (Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas Sobre o Cérebro, [www.cinapce.org.br](http://www.cinapce.org.br)) da Fapesp, cujo foco é o desenvolvimento de novos métodos e técnicas que permitam avançar no entendimento do cérebro e desordens associadas, baseado em dados multimodais centrados em equipamentos de MR com campo de 3T.

Para que isso fosse possível, além dos estudos necessários para entender o fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (Seção 1.1) e as peculiaridades dos estudos de MRS *in vivo* (Seção 1.2), uma ampla revisão sobre os trabalhos realizados nessa área específica de fMRS teve de ser feita para identificar quais abordagens poderiam ser realizadas com os meios disponíveis na Unicamp (Seção 2). Paralelamente, foi feita também um estudo dirigido sobre os modelos existentes para explicar a dinâmica bioquímica de um neurônio e seu entorno, para compreender o significado das medidas feitas com MRS (Seção 2.2).

No Capítulo 3 são apresentados os diversos experimentos desenvolvidos ao longo do projeto e todas as peculiaridades encontradas nestes experimentos. Este capítulo mostra quais as abordagens que foram adotadas no trabalho para realizar os experimentos de fMRS *in vivo*, tratando inicialmente dos protocolos de aquisição e paradigmas (Seção 3.1), em seguida da aquisição (Seção 3.2), e finalmente dos protocolos de pós processamento dos dados (Seção 3.3).

No Capítulo 4, os resultados encontrados nos experimentos são apresentados juntamente com uma breve discussão sobre as conclusões e consequências de cada um destes experimentos para o decorrer do projeto. Finalmente, no Capítulo 5, apresentamos as conclusões finais sobre os experimentos de fMRS *in vivo* feitos na Unicamp até o momento.

# 1 Fundamentos

## 1.1 Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Dentre os átomos que compõem a matéria existem alguns ( $^1H$ ,  $^2H$ ,  $^{10}B$ ,  $^{11}B$ ,  $^{13}C$ ,  $^{14}N$ ,  $^{15}N$ ,  $^{17}O$ ,  $^{19}F$ ,  $^{23}Na$ ,  $^{29}Si$ ,  $^{31}P$ ,  $^{35}Cl$ ,  $^{113}Cd$ ,  $^{195}Pt$ ) que apresentam o que chamamos de spin nuclear. Embora não exista uma regra simples de se calcular se um determinado átomo terá ou não spin, para o caso dos átomos cujos prótons e/ou nêutrons apresentam-se em quantidades ímpares, como no caso do  $^1H$  e  $^{13}C$ , esta característica sempre estará presente.

Esta característica da intrínseca da matéria interage com campos magnéticos e pode ser descrita por um modelo quântico de operadores e auto-vetores. Para um sistema de spins sujeito a um campo magnético constante  $B_0$  na direção  $\hat{z}$ , os experimentos mostram que estes auto-valores dos operadores assumem valores discretos. Este é o caso do operador módulo quadrado do momento angular total  $\vec{L}^2$ :

$$\vec{L}^2 = \hbar^2 l(l+1), \quad (1.1)$$

onde  $\hbar$  é a constante de Plank reduzida ;  $l = 1, 2, 3, 4, \dots$  é o número quântico que define os auto-valores discretos do operador  $\vec{L}^2$ .

Neste resultado, observamos que o módulo do momento angular total permanecer invariante no tempo mas que não necessariamente garante a medida direta do momento angular total ( $\langle \vec{L} \rangle$ ), uma vez que não se pode inferir o sentido do momento angular, fato que pode ser interpretado como consequência do princípio da incerteza, que faz com que a partícula sempre assuma um movimento de precessão mesmo estando em equilíbrio. Este movimento de precessão também é bem definido, e é caracterizado por sua frequência definida pela chamada equação de Larmor:

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0, \quad (1.2)$$

onde  $\nu_0$  é a chamada frequência de Larmor e  $\gamma$  é uma constante de proporcionalidade do núcleo denominada *constante giromagnética*.<sup>1</sup>

Nota-se com isso a dependência direta do movimento de precessão com o campo magnético aplicado no núcleo. Esse fato permite à espectroscopia por MR estudar não só o núcleo mas seu entorno, pois pequenas variações locais de campo magnético refletem-se na frequência de precessão do núcleo. De forma geral estas pequenas variações são atribuídas a dois fatores. Um deles é a blindagem eletrônica do núcleo, que chamamos de *Chemical Shift*, e reflete o grau de oxidação do núcleo, contribuindo para um deslocamento da frequência de precessão. O outro fator é o chamado Acoplamento-J, que é resultado da soma, em um modelo quântico, dos momentos angulares presentes dentro de uma mesma molécula. Esta soma divide os níveis de energia em valores intermediários que se refletem como um *split* da frequência de precessão em torno de um valor. Consequentemente, pode-se assumir que cada molécula terá um conjunto de diferentes frequências que permitem interagir não só com o átomo mas sua vizinhança, ou seja, a molécula como um todo.

Outra consequência do modelo quântico é a projeção na direção  $\hat{z}$  do momento angular total,  $\langle \vec{L}_z \rangle$ , que diferentemente de  $\langle \vec{L} \rangle$ , possui valor mensurável, e é definido como:

$$\langle \vec{L}_z \rangle = m\hbar, \quad (1.3)$$

onde  $m = 0, \pm\frac{1}{2}, \pm\frac{3}{2}, \pm\frac{5}{2} \dots$ ; é o número quântico que define os auto-valores discretos do operador  $L_z$ .

Consequentemente, segundo a definição de momento magnético<sup>2</sup>:

$$\mu_z = \gamma m\hbar. \quad (1.4)$$

Para o caso mais comum de spin, como o  $^1H$  e  $^{13}C$ , onde temos apenas dois estados possíveis,  $m$  pode assumir os valores  $m = \frac{1}{2}$  ou  $m = -\frac{1}{2}$  (também conhecidos com *up*[↑] e *down*[↓], respectivamente).

Esta condição quântica é importante pois a partir desta explica-se o chamado Efeito Zeeman. Este efeito consiste em que, sem a presença do campo magnético, as energias  $E$  dos estados *up* e *down* são degeneradas, mas na presença do campo magnético irão abrir-se em dois níveis distintos:

---

<sup>1</sup>Para os átomos de interesse no trabalho:  $\frac{\gamma_H}{2\pi} \approx 42,6 \frac{MHz}{Tesla}$ ,  $\frac{\gamma_{^{13}C}}{2\pi} \approx 10,7 \frac{MHz}{Tesla}$   
<sup>2</sup> $\vec{\mu} = \gamma\vec{L}$

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma m \hbar B_0, \quad (1.5)$$

$$\therefore \Delta E = E_{\downarrow} - E_{\uparrow} = \gamma \hbar B_0 = h \nu_0.$$

Estes dois novos níveis, um de menor e outro de maior energia, são atribuídos ao alinhamento, paralelo ( $\uparrow$ ) ou antiparalelo ( $\downarrow$ ), que cada núcleo pode assumir com relação ao campo magnético. Embora o estado de maior energia represente um equilíbrio instável, caso a diferença de energia entre os estados for comparável a energia térmica disponível, é esperado que as populações  $n_{\uparrow}$  e  $n_{\downarrow}$  respectivas a cada alinhamento estejam sempre povoadas. Pois em uma amostra macroscópica que possui energia térmica suficiente, sempre existirão átomos que irão transitar de um estado para o outro (tanto  $up \rightarrow down$  quanto  $down \rightarrow up$ ). No entanto, no equilíbrio térmico, as respectivas populações de átomos com spins nucleares  $up$  e  $down$  terão uma proporção constante que segue a distribuição de Boltzman:

$$\frac{n_{\uparrow}}{n_{\downarrow}} = \exp \left[ \frac{\Delta E}{k_B T} \right] = \exp \left[ \frac{h \nu_0}{k_B T} \right] \approx 1 + \left( \frac{h \nu_0}{k_B T} \right), \quad (1.6)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzman.

Estas populações de spins irão criar o efeito macroscópico chamado de magnetização  $\vec{M}$ , cuja magnitude nada mais é que a simples diferença entre as populações de spins:

$$M = \mu (n_{\uparrow} - n_{\downarrow}) = \left( \frac{\gamma \hbar}{2\pi} \right)^2 \frac{n B_0}{4 k_B T}, \quad (1.7)$$

onde  $n = n_{\uparrow} + n_{\downarrow}$  é o número total de spins.

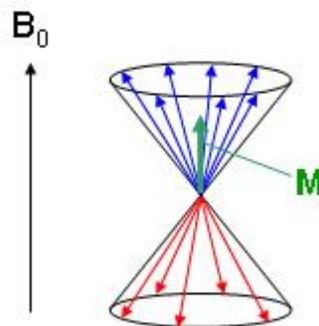


Figura 1.1: Representação dos spins e da magnetização.

### 1.1.1 Excitação e Detecção

Como mencionado, o movimento de precessão dos spins tem uma frequência bem definida que depende não só do campo aplicado (Equação 1.2), mas também do meio molecular onde o átomo se encontra (efeitos de Deslocamento Químico e Acoplamento-J). Com isso um campo magnético oscilante, como o de uma onda eletromagnética, com as mesmas frequências da de precessão, pode interagir com a manifestação macroscópica dos spins, a magnetização, através de um processo de ressonância.

Qualitativamente uma onda eletromagnética de amplitude  $B_1$ , uma frequência de  $\frac{\gamma}{2\pi}$  e polarização em  $\hat{y}$  faz com que as populações  $n_{\downarrow}$  e  $n_{\uparrow}$  se redistribuem modificando a componente  $M_z$ . Além disso, as fases dos spins, que antes da incidência da onda estavam distribuídas aleatoriamente anulando qualquer componente de  $\vec{M}$  no plano transversal  $xy$  irão alinhar-se criando a componente  $\vec{M}_{plano}$  que gira no plano  $xy$ .

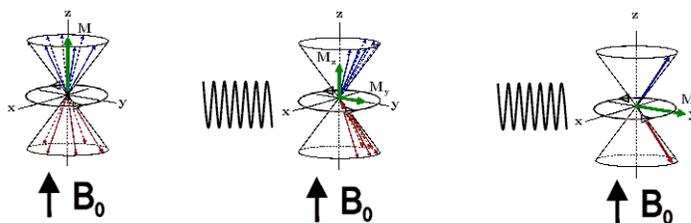


Figura 1.2: Dinâmica dos spins quando em ressonância.

Matematicamente a equação de Bloch (HAACKE et al., 1999) é a que descreve esta dinâmica da magnetização:

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma \left( \vec{M}(t) \times \vec{B}(t) \right) - \frac{M_x(t)\hat{x} + M_y(t)\hat{y}}{T_2} - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \hat{z}, \quad (1.8)$$

onde  $\vec{B}(t)$  é o campo magnético experimentado pelo núcleo; tipicamente é a soma do campo magnético  $B_0$  com as correções de Deslocamento Químico e Acoplamento-J e do campo magnético  $B_1(t)$  da onda eletromagnética.  $M_0$  é a magnetização de equilíbrio térmico, tipicamente para  $t \rightarrow \infty$ .  $T_1$  é uma constante de decaimento que define a velocidade com que as populações de spins retornam ao estado de equilíbrio térmico  $M_0$ , e é denominada “tempo de relaxação spin-lattice”.  $T_2$  é uma constante de decaimento que define a velocidade com que os spins perdem a coerência, e por isso é denominada “tempo de relaxação spin-spin”.

Sendo assim é possível prever o comportamento da magnetização sobre qualquer campo magnético. Além de descrever a excitação de um conjunto de átomos (mostrado na Figura 1.2) a equação de Bloch também descreve a volta do sistema para o equilíbrio térmico.

Neste exemplo, a magnetização foi posicionada no plano  $xy$ . Nesta configuração o posicionamento de bobinas perpendiculares a este plano, mostrado na Figura 1.3(a) faz com que o movimento de precessão da magnetização crie, por efeito Faraday, correntes proporcionais a intensidade da magnetização. Logo a trajetória de volta ao ponto de equilíbrio térmico da magnetização pode ser acompanhada, como representado na Figura 1.3(b)

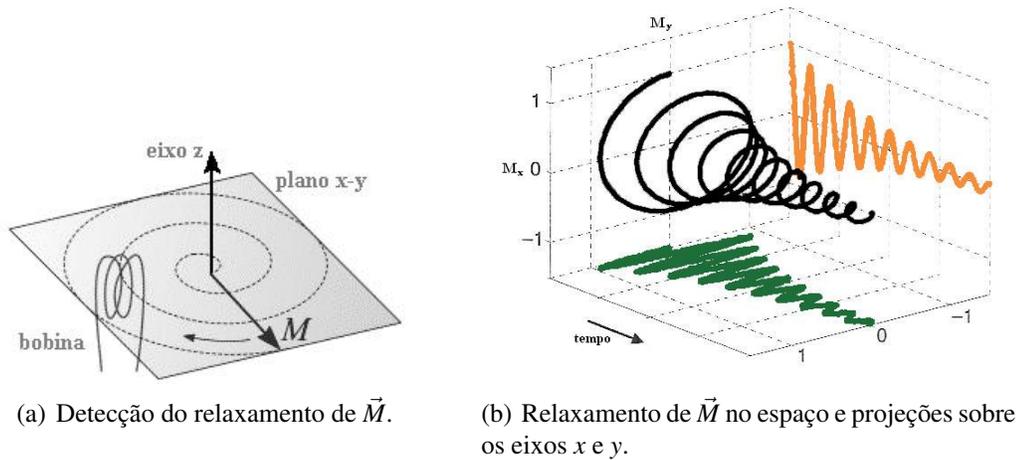


Figura 1.3: Trajetória de  $\vec{M}$  durante o relaxamento.

Dessa forma somos capazes de medir as projeções de  $\vec{M}$  nos eixos  $x$  e  $y$  (Equação 1.8), às quais atribuímos o nome de *Free Induction Decay* (FID):

$$FID \propto M_{xy} = M_x + iM_y. \quad (1.9)$$

Para a espectroscopia, usa-se a representação do FID no espaço de Fourier (de Graaf, 2007), dado pelas componentes real (1.10) e imaginária (1.11):

$$R(\omega) = A(\omega)\cos(\varphi) - D(\omega)\sin(\varphi) \quad (1.10)$$

e

$$I(\omega) = A(\omega)\sin(\varphi) + D(\omega)\cos(\varphi), \quad (1.11)$$

onde  $A(\omega)$  é denominado espectro de Absorção, dado por

$$A(\omega) \propto \frac{M_0 T_2}{1 + \omega^2 T_2^2}, \quad (1.12)$$

e  $D(\omega)$  é o espectro de Dispersão, dado por

$$D(\omega) \propto \frac{M_0 \omega T_2^2}{1 + \omega^2 T_2^2}. \quad (1.13)$$

Suas componentes reais, definida na Equação 1.10, são Lorentzianas (Figura 1.4), centradas na frequência  $\nu_0$  de Larmor, a componente de absorção possui largura à meia altura é igual a  $1/(\pi T_2)$  e, o mais importante para a espectroscopia, área sob o pico proporcional ao módulo da magnetização  $\vec{M}$  (que por sua vez é proporcional ao número de spins alinhados com o campo Magnético, Equação 1.7, e consequentemente à concentração molar do átomo). Assim,

partindo de uma referência conhecida e ajustando o FID tal que  $\varphi = 0$  nas Equações 1.11 e 1.10, e separando as componentes de absorção e dispersão, seria possível identificar a molécula devido à distribuição dos picos no espectro real de absorção, e consequentemente inferir sua concentração molar.

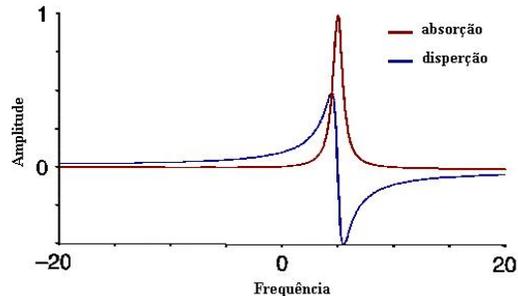


Figura 1.4: FID no espaço de Fourier: espectro.

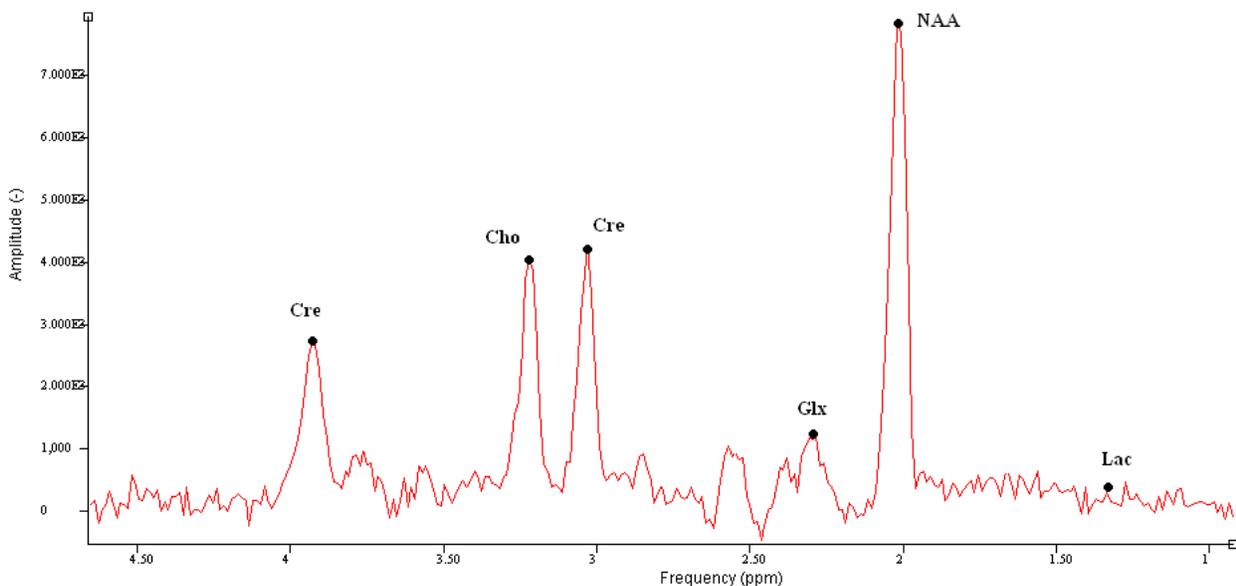


Figura 1.5: Exemplo de espectro *in vivo*.

Finalmente é pertinente comentar que apesar de poder utilizar Hertz ( $Hz$ ) como unidades das abscissas do espectro, este é geralmente apresentado usando unidades  $ppm$  (partes por milhão). Isto é feito para que se crie uma independência da resposta espectral com o campo, pois se a unidade utilizada fosse o  $Hz$  o eixo de frequências seria proporcional ao campo e consequentemente a localização dos picos dependeria deste campo. Logo introduz-se a escala

*ppm* a partir da equação:

$$\sigma = \frac{f_{transmitter} - f_{amostra}}{f_{transmitter}} \times 10^6 + \sigma_0, \quad (1.14)$$

onde  $f_{amostra}$  é a frequência medida da amostra,  $f_{transmitter}$  é a frequência de operação do transmissor e  $\sigma_0$  é uma constante de ajuste que cria uma referência com relação a um padrão. No caso da espectroscopia *in vivo*, o padrão para  $^1\text{H}$ -MRS é o pico do grupo metil do metabólito N-acetil-aspartato centrado em  $2,02\text{ppm}$ , e para  $^{31}\text{P}$ -MRS é o pico da fosfocreatina centrado em  $0,00\text{ppm}$ .

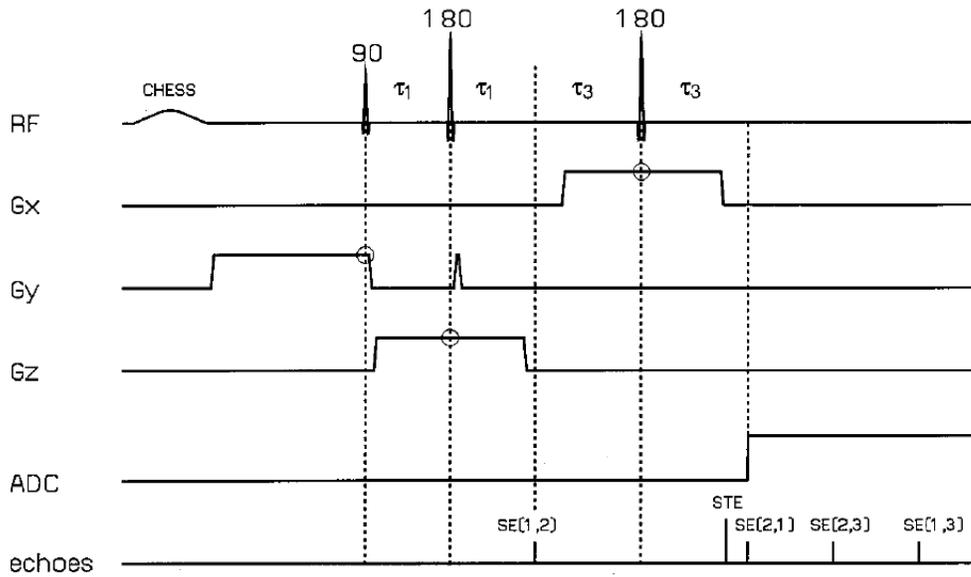
## 1.2 Sobre experimentos *in vivo*

Na teoria apresentada até aqui não houve preocupação com as condições experimentais nas quais os resultados seriam medidos. No entanto este trabalho contou principalmente com medidas realizadas em ambiente *in vivo*, e por causa disso apresenta muitas peculiaridades que o diferenciam de qualquer experimento *in vitro* que devem ser consideradas na interpretação dos dados.

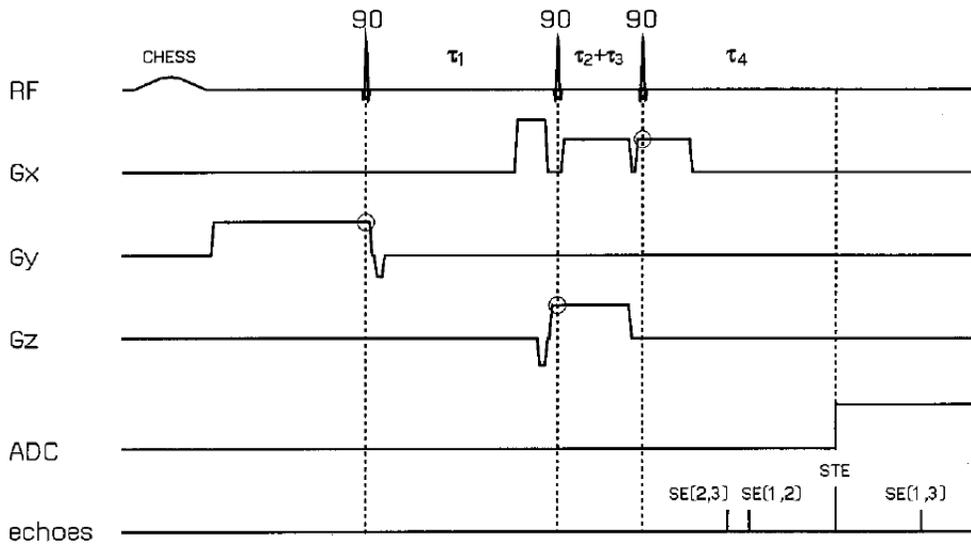
### 1.2.1 Sequências de pulso

Por se tratar de meios biológicos, todo metabólito estará dissolvido em água. Embora isto só ocorra em experimentos que utilizam átomos de  $^1\text{H}$ , deve-se lembrar que a grande maioria dos experimentos *in vivo* utiliza este átomo, e por isso é uma peculiaridade pertinente.

O grande problema gerado pelo sinal da água deve-se ao fato dela ser o solvente nos quais os metabólitos se encontram, e conseqüentemente o sinal atribuído aos metabólitos deverá ser várias ordens de grandesa menores que o sinal da da água. Sendo assim, para que seja possível medir qualquer outro sinal que não o da água, é preciso adicionar à sequência de pulsos de aquisição do sinal, pulsos de supressão da água. Estes são pulsos seletivos que têm a finalidade de manter a magnetização dos átomos de hidrogênio nas moléculas de água sempre no estado excitado, reduzindo assim o número de moléculas de água que relaxam e geram algum tipo de sinal. O pulso mais utilizado para esta finalidade é conhecido como *Chemical-Shift-Selective (CHESS)* estando presente nas principais sequências de pulso para aquisição espectroscópica, como a *Point Resolved Spectroscopy (PRESS)*, Figura 1.6(a), e a *Stimulated Echo Acquisition Mode (STEAM)*, Figura 1.6(b).



(a) Sequência PRESS



(b) Sequência STEAM

Figura 1.6: Sequências de pulso para aquisição espectroscópica.

A sequência PRESS possui três pulsos de radio frequência RF de  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  e  $180^\circ$ ,  $\tau_1$  é o tempo entre o primeiro e segundo pulso (RF) e  $\tau_1 + \tau_3$  é o intervalo de tempo entre o segundo e terceiro pulsos de RF. O tempo de eco (TE) é  $2\tau_1 + 2\tau_3$ .

A sequência STEAM possui três pulsos RF de  $90^\circ$  o  $\tau_1$  é igual ao  $\tau_4$ ,  $\tau_1 + \tau_4$  é o tempo ao eco (TE), enquanto  $\tau_2 + \tau_3$  é conhecido como o tempo de mistura (TM). Um fato importante na sequência STEAM é que somente a metade da magnetização transversal obtida pelo primeiro pulso de  $90^\circ$  é transformada em magnetização longitudinal pelo segundo pulso de  $90^\circ$ , diminuindo o SNR por um fator 2. O terceiro pulso leva a magnetização longitudinal armazenada pelo segundo pulso de RF de novo ao plano transversal para formar o STE (do inglês, *Stimulated Echo*).

Em ambas as sequências,  $G_x$ ,  $G_y$  e  $G_z$  são os gradientes de campo magnético, os quais são gerados por bobinas solenoidais nas quais correntes elétricas opostas (em diferentes bobinas) produzem campos magnéticos que se combinam para gerar um gradiente de campo magnético numa única direção ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ). A intersecção resultante da aplicação dos gradientes de campo magnético em conjunto com pulsos de RF específicos permite definir o volume de interesse (*Volume of Interest* - VOI), tal como se mostra na

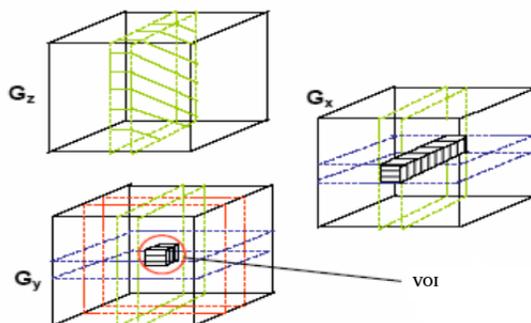


Figura 1.7: Escolha do VOI utilizando gradientes.  
Figura 1.7.

## 1.2.2 Fontes de erro

Um dos grandes desafios para qualquer experimento de espectroscopia de RM *in vivo* são as fontes de erros adicionais a um experimento *in vitro*, pois além da dificuldade inicial de se alcançar um padrão satisfatório na busca de adaptar a teoria apresentada à prática, um experimento *in vivo* adiciona uma infinidade de erros, os quais podem alcançar amplitudes maiores que o sinal medido e dificilmente podem ser modelados e isolados.

Dentre estes erros discutiremos alguns que representam os principais desafios das aquisições *in vivo*.

### **Sinal da água e lipídios**

Como vimos a maioria dos experimento *in vivo* deve utilizar sequências de pulso específicas para suprimir o sinal da água. Porém, mesmo com estes pulsos de supressão, o sinal residual da água costuma alcançar magnitudes até 10 vezes maiores que o sinal dos metabólitos e este resíduo da água sempre irá adicionar alguma distorção de *baseline* em seus arredores.

Por outro lado, o sinal das macromoléculas não terá uma amplitude significativa, mas sim um intervalo de frequências muito amplo. Seus átomos de hidrogênio apresentam tempos de relaxação  $T_2$  muito curtos, e como discutido em 1.1.1, a Lorentziana correspondente terá uma largura à meia altura muito ampla, contribuindo para a modificação da *baseline* em todo o espectro.

Já os lipídios terão uma resposta intermediária. Seus tempos de relaxação  $T_2$  são comparativamente longos se comparados às macromoléculas, mas não longos o suficiente para apresentar uma resolução espectral comparável à dos metabólitos. Além disso, seu deslocamento químico é suscetível também à direção do campo  $B_0$ , o que resulta em uma contribuição à *baseline* muito mais complicada de se modelar.

### **Volume parcial**

Um problema comum em qualquer aquisição de imagens médicas, os artefatos de volume parcial são fruto da não homogeneidade dos tecidos biológicos. Isso pois os voxels de aquisição possuem tamanho finito, e nunca pontual, o que resulta em que o volume da medida sempre terá como sinal a média das diversas partes (tipos diferentes de tecido) contidas neste volume.

No caso da espectroscopia *in vivo* este problema se agrava, pois para obter sinais detectáveis os volumes escolhidos para análise são da ordem de centímetros cúbicos, tipicamente  $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ . Como dentro de um volume deste tamanho encontramos não só milhares de células mas também diferentes tecidos, o sinal medido sempre representará uma média composta pelos diferentes tecidos e células.

### **Limitações de hardware**

Apesar das limitações de *hardware* serem um problema presente em qualquer montagem experimental, as discutidas nesta seção descrevem algumas das peculiaridades inerentes aos equipamentos de RM médicos, pois devemos realçar que as grandes dimensões deste tipo de equipamentos apenas tornam mais complicado atingir os padrões desejáveis para aplicar as

teorias.

Um dos aspectos experimentais mais importantes para qualquer experimento de RM é a homogeneidade do campo magnético aplicado, pois quanto maior a homogeneidade maior a SNR e melhor a resolução espectral. No entanto, em experimentos *in vivo* o próprio indivíduo que será examinado introduz inhomogeneidades no campo. Para corrigir esse problema desenvolveu-se um processo denominado *shimming*, neste primeiras correções são feitas de forma passiva com barras de metal cujas propriedades magnéticas são bem definidas, tais barras irão deformar o campo de forma a compensar algumas das inhomogeneidades. Para se obter uma correção mais eficiente, e ao mesmo tempo adaptável, são utilizados bobinas convencionais para criar ativamente campos magnéticos e permitem correções mais localizadas (por exemplo, no voxel onde será adquirido o sinal de espectroscopia) e que podem ser ajustados para condições específicas de desvios na homogeneidade do campo magnético.

Outro fator presente à aquisição de espectros de MRS são as correntes parasitárias ou *eddy-currents*, que são correntes induzidas no processo de geração dos gradientes de campo magnético utilizados para a localização do sinal. Esses gradientes são gerados na forma de pulsos quadrados, ou seja, a corrente em uma bobina deve ser instantaneamente maximizada, mantida por um tempo e reduzida a zero instantaneamente. No entanto, como não se pode garantir o caráter instantâneo mencionado, as mudanças abruptas nos gradientes induzem correntes parasitárias na estrutura do magneto, que por sua vez geram campos magnéticos indesejados. Isso adiciona um fator de inhomogeneidade ao campo. Estas correntes parasitárias podem ser corrigidas, entre outras formas, por bobinas de compensação. Além disso, no pré-processamento dos dados seus efeitos podem ser reduzidos dividindo-se o sinal no domínio temporal pelo sinal não suprimido da água, ou usando uma correção de fase ponto a ponto a partir do sinal não suprimido da água.

### **Ruído biológico**

Embora o termo seja extremamente vago, no caso de experimentos de RM destacam-se os artefatos de movimento. Mesmo garantindo que durante o experimento não ocorram movimentos conscientes por parte do sujeito, em um experimento *in vivo* sempre existirão movimentos involuntários, como movimentos de respiração ou reflexos do ciclo cardíaco. Estes, embora possam ser monitorados, não são facilmente modelados pois assumem características diferentes para cada indivíduo.

### Consequências

Nesta breve discussão apresentamos algumas das principais fontes de erro que prejudicam a qualidade dos espectros medidos. Quantitativamente, estes erros diminuem a razão sinal-ruído (*SNR*):

$$SNR = \frac{A_{signal}}{A_{noise}}, \quad (1.15)$$

onde  $A_{signal}$  e  $A_{noise}$  são as amplitudes destes sinais.

Assim, nas metodologias convencionais, este problema é atacado com aquisições mais longas, para alcançar estatísticas maiores que melhorem a *SNR*. Mas esta abordagem não pode ser feita indiscriminadamente, pois ainda estamos tratando de experimentos *in vivo*. Ainda mais pertinente ao trabalho, é que esta abordagem é incompatível com aquisições dinâmicas. Logo, nos trabalhos que propõem aquisições dinâmicas de MRS, vemos que o principal enfoque é encontrar maneiras de melhorar a *SNR* dos espectros por vias não convencionais que ao mesmo tempo corresponderiam a uma janela temporal menor que a dos métodos atuais.

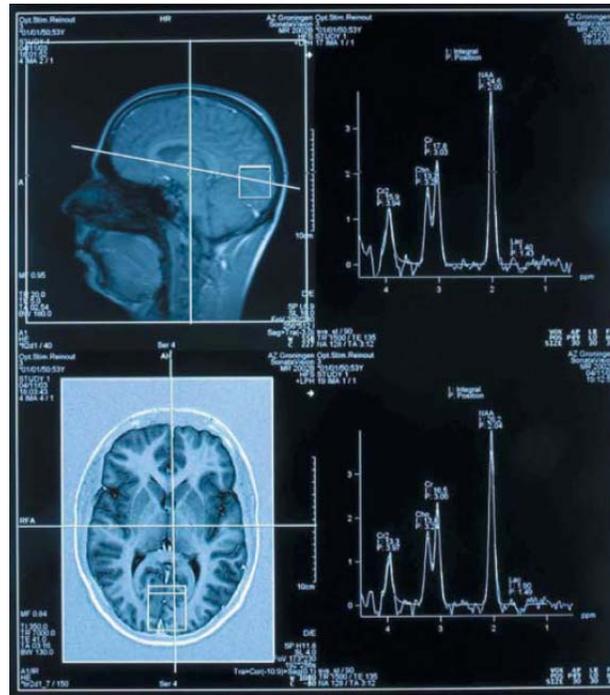
### 1.2.3 Volume de interesse

Nos experimentos de espectroscopia *in vivo* é essencial ser capaz de atribuir uma localização anatômica ao sinal medido, ou seja, utilizar alguma técnicas de aquisição para localizar o volume de interesse (*Volume of Interest - VOI*), e atribuir àquela região os dados experimentais coletados.

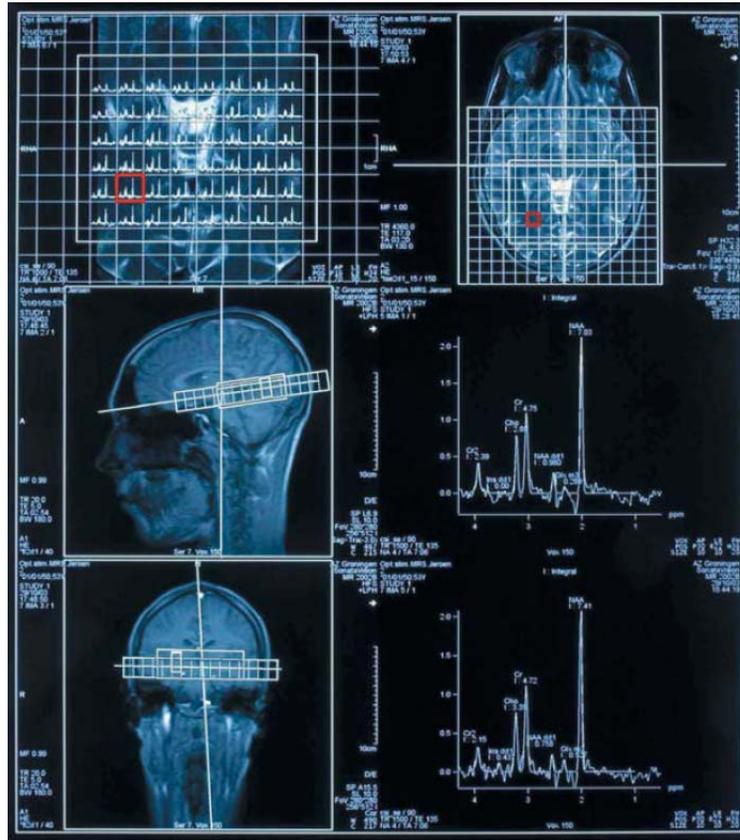
Existem diferentes técnicas de aquisição para localização na MRS, mas que podem ser divididas em dois grandes grupos:

- i Voxel único ou SVS (*Single Voxel Spectroscopy*) (Figura 1.8(a));
- ii Imagens espectroscópicas ou MRSI (*Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging*) (Figura 1.8(b)).

O primeiro grupo faz a aquisição de um único voxel, e por isso permite uma maior resolução espectral. Por outro lado, as técnicas do segundo grupo permitem um mapeamento espacial das variações dos metabólitos numa dada região anatômica (p.ex., o cérebro), para uma rede de voxels em uma única aquisição.



(a) Figura 2 de (BOUCARD et al., 2005): exemplo de SVS



(b) Figura 2 de (BOUCARD et al., 2005): exemplo de MRSI

Figura 1.8: Técnicas de aquisição para localização na MRS.

A escolha de uma ou outra técnica depende do experimento que se queira realizar. Para os experimentos dinâmicos deste trabalho escolheu-se trabalhar apenas com voxels únicos. Pois a maioria dos trabalhos estudados optou pela SVS, que permite uma melhor resolução temporal. Além disso, a resolução espectral em aquisições dinâmicas é uma prioridade, e por isso deve ser mantida a melhor possível.

### 1.2.4 Efeito BOLD

O efeito BOLD (Blood-Oxygen-Level Dependent) foi descoberto em 1990 (OGAWA et al., 1990) e desde então tem contribuído enormemente para os estudos funcionais do cérebro. O efeito BOLD decorre do fato que os níveis de desóxi-hemoglobina e oxihemoglobina da rede capilar apresentam variações que são correlacionadas à ativação neuronal, causando alterações na suscetibilidade magnética da região ativada. Esta alteração é passível de ser medida através de experimentos de MR, e é principalmente utilizada na criação de imagens por contraste BOLD que permitem identificar quais regiões cerebrais apresentaram variações hemodinâmicas associadas a um estímulo sensorial ou tarefa cognitiva. Neste projeto o mesmo tipo de estímulo utilizado na aquisição de fMRS foi utilizado para gerar estas imagens por contraste BOLD e identificar a região de interesse para aquisição de fMRS, servindo assim como guia para o posicionamento do voxel de MRS.

Por outro lado, em um trabalho de 2001 (ZHU; CHEN, 2001), os autores mostraram que o efeito BOLD altera o espectro de MRS. Eles observaram que os espectros obtidos durante o período de estímulo apresentavam um aumento na amplitude e uma diminuição na largura de linha dos picos, se comparados aos obtidos sem o estímulo. Isto foi verificado para os principais picos dos metabólitos N-acetila-aspartato e Creatina total, e também para o pico da água, sendo que as variações reportadas foram da ordem de 3% de aumento na amplitude e 2% de diminuição na largura de linha. Em (MANGIA et al., 2007a) estas conclusões foram estendidas para os experimentos feitos em 7T mostrando-se ainda mais significativas, Para campos de 3T não se encontrou nenhuma publicação que aborde o assunto, logo neste trabalho não foram descartadas possíveis variações decorrentes do efeito BOLD.

### 1.2.5 Quantificação de metabólitos

Por serem tão peculiares, existem métodos específicos para a quantificação de sinais espectroscópicos de ressonância magnética *in vivo*; estes métodos podem atuar no domínio temporal ou da frequência.

## AMARES

O AMARES (*Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data*) (VANHAMME; van den Boogaart; HUFFEL, 1997), disponível no software livre jMRUI (<http://www.mrui.uab.es/>) (NARESSI et al., 2001), é um método iterativo de quantificação no domínio do tempo. Este método ajusta os  $N$  pontos medidos que compoem o sinal  $y_n$  por uma soma de  $K$  senóides que decaem exponencialmente:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k e^{i\phi_k} e^{(-d_k + i2\pi f_k)t_n} + e_n, \quad (1.16)$$

onde  $a_k$  é a amplitude,  $\phi_k$  a fase,  $d_k$  o fator de decaimento e  $f_k$  a frequência da  $k$ -ésima senoide;  $t_n$  é o tempo de amostragem dos dados e  $e_n$  é ruído branco complexo.

Estas funções modelam cada ressonância de maneira independente. Por isso, a partir de algum conhecimento prévio, como o acoplamento-J ou o Deslocamento Químico das ressonâncias, o usuário pode adicionar restrições ao ajuste e limitar os graus de liberdade do sistema. Um exemplo seria um metabólito composto por 3 picos com proporções a serem definidas a priori:  $a_2 = xa_1$  e  $a_3 = ya_1$ , onde  $x$  e  $y$  são as proporções impostas pelo usuário.

## LCModel

O *LCModel* (*Linear Combination of Model spectra*) (PROVENCHER, 2001), implementado no *software* de mesmo nome, é um método no domínio da frequência que difere do método discutido anteriormente, pois sua função modelo consiste não mais de uma soma de ressonâncias isoladas, mas sim de uma soma de espectros completos. A ideia por trás deste método é que alguns metabólitos geram não uma, mas múltiplas, ressonâncias no espectro (ver Figura 1.5). Dessa forma, o método define funções específicas para cada metabólito, as quais podem ser combinadas linearmente para ajustar os dados. Estas funções podem ser medidas de MRS *in vitro* de metabólitos isolados, ou podem ser modeladas utilizando princípios de Mecânica Quântica (SMITH et al., 1994), levando sempre em conta os parâmetros da sequência de pulso e a magnitude do campo magnético utilizados na aquisição.

## QUEST

A abordagem de ajustar os dados com uma combinação linear de espectros completos não é exclusiva do *LCModel*. O método *QUEST* (*QUantitation based on QUantum ESTimation*) (RATINEY et al., 2005), também implementado no software *jMRUI*, segue esse mesmo princí-

pio. No entanto, este difere do LCModel pois ao contrário deste o método *QUEST* faz o ajuste no domínio do tempo.

### 1.2.6 Concentrações absolutas versus concentrações relativas

Independentemente do método utilizado, um dos problemas encontrados ao analisar dados de MRS *in vivo* é a dificuldade de determinar o valor absoluto das concentrações dos metabólitos medidos. Isso acontece pois, embora a magnetização  $M_0$  seja diretamente proporcional ao número de spins, que por sua vez é proporcional à concentração, a medida de  $M_0$  é indireta: o que se observa é uma corrente induzida proporcional à magnetização no plano  $xy$ . De fato, o sinal medido de MRS de um dado metabólito é proporcional ao número de aquisições, ao ganho do receptor, à frequência de Larmor, à concentração molar e ao volume da amostra (voxel), sendo também influenciado por funções mais complexas relativas à modulação do sinal pela sequência de pulsos<sup>3</sup> e pela bobina utilizadas na aquisição<sup>4</sup> (de Graaf, 2007). Como vários dos parâmetros relativos à bobina de aquisição não são conhecidos, a determinação direta da concentração a partir do sinal medido é impossível.

Para contornar este problema utiliza-se algum composto de calibração com uma concentração conhecida, cujo sinal de MRS é utilizado como referência para os demais metabólitos. No entanto, para realizar um cálculo preciso da concentração, apenas medir o sinal da referência não basta, é necessário fazer correções relativas a diferenças nos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ , susceptibilidade magnética, etc. Devido à dificuldade em calcular correções precisas, particularmente no ambiente clínico, é prática comum o uso de concentrações relativas, onde são calculadas razões entre metabólitos medidos numa mesma aquisição (ou mesma sessão). Embora as concentrações relativas forneçam menos informação que as absolutas, ainda assim essa informação é de grande valia para estudos clínicos.

---

<sup>3</sup>Inclui parâmetros como os tempos de repetição TR e eco TE, o número e tipo de pulsos de radio frequência, e os tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ .

<sup>4</sup>Inclui parâmetros relativos à geometria, fator dB e qualidade da bobina.

## 2 *Revisão da literatura*

Como parte desse estudo procedeu-se um amplo exame da literatura sobre a viabilidade dos experimentos de fMRS, e sobre como contornar os problemas resumidos na Seção 1.2.2.

Na busca por alguma alternativa de reduzir a *SNR* sem perder a informação temporal, pode-se sugerir que o simples aumento do campo magnético seria suficiente. De fato isto é apenas em parte verdade, pois, além de não ser uma opção na maioria dos experimentos, estudos apontam para um limite superior de  $\sim 4.0T$  no valor do campo. Constatou-se em (de Graaf et al., 2003) que a melhora de *SNR* acaba sendo contrabalanceada por uma diminuição na resolução espectral, fruto de efeitos microscópicos de susceptibilidade magnética.

Por estas razões, neste capítulo encontra-se apenas uma breve discussão de três técnicas encontradas na literatura, que apresentam algum tipo de proposta visando aprimorar a *SNR* sem sacrificar a informação temporal ou exigir mudanças drásticas no *hardware* dos *scanners*. As duas primeiras foram estudadas apenas no início do projeto, uma vez que não se mostraram muito práticas para os objetivos deste. Já a terceira, que foi escolhida como técnica principal do projeto, será apresentada de forma mais aprofundada juntamente com uma discussão dos principais trabalhos publicados sobre o assunto.

### **MRS dinâmica com $^{13}C$**

Nos experimentos de espectroscopia de hidrogênio discutiu-se na Seção 1.2.2 a distorção da *baseline* gerada pelas moléculas de água e macromoléculas. Para contornar esse problema, encontramos experimentos que substituem o átomo de hidrogênio por outro que tenha um contraste maior e assim uma *SNR* melhor, como por exemplo o isótopo  $^{13}C$ .

O carbono, junto com o hidrogênio, é o principal componente das substâncias orgânicas, sendo encontrado naturalmente na proporção de 98,9% de  $^{12}C$  e 1,1% de  $^{13}C$ . No entanto, dentre estes isótopos, apenas o último possui spin nuclear e pode ser detectado por *MRS*. Isso prejudica sua medida devido à baixa abundância natural, mas permite a administração ao sujeito, ou animal, de compostos marcados fabricados em laboratório. Por ter uma abundância tão baixa pode-se assumir que sua presença no organismo decorre exclusivamente da substância

artificial marcada, gerando um grande contraste. Além disso, sabendo qual átomo de  $^{12}\text{C}$  de uma substância orgânica foi substituído por um  $^{13}\text{C}$ , é possível acompanhar o caminho metabólico deste átomo.

As aplicações desta técnica para o estudo do metabolismo cerebral têm sido várias, incluindo o estudo do transporte de Glicose no cérebro humano; a medida do metabolismo do glicogênio cerebral em animais durante situação de hipoglicemia; a detecção de um metabolismo extremamente lento de glicogênio no cérebro humano; o achado de que o fluxo de piruvato carboxilase é essencial para o cérebro humano *in vivo*; a demonstração de que o metabolismo glial é significativo em repouso e basicamente oxidativo *in vivo*; o estudo do fluxo de malato-aspartato; o achado de que o metabolismo de Glutamato é afetado por estimulação fisiológica focal do cérebro humano, entre outros. Uma revisão desta técnica e aplicações pode ser encontrada em (GRUETTER et al., 2003).

Além disso, para um átomo de carbono ligado ao hidrogênio, é possível através do acoplamento escalar heteronuclear utilizar parte da intensidade do sinal de hidrogênio para aumentar tanto a sensibilidade quanto a resolução do espectro em questão (de Graaf, 2007). No (ROTHMAN et al., 1985), um dos primeiros trabalhos a utilizar  $^1\text{H} - \text{MRS}$  acoplado ao  $^{13}\text{C}$  de forma dinâmica e *in vivo*, monitorou-se a contribuição relativa da Glicose e glicogênio cerebral na formação do Lactato em situação de isquemia em cérebro de ratos. Em (Van Zijl et al., 1997) utilizou-se essa técnica para avaliar o transporte de Glicose e a cinética metabólica no cérebro de gatos. Nesse trabalho foi usada uma sequência rápida que permitia a aquisição de 64 a 128 espectros em poucos segundos, e dessa forma monitoraram o influxo de Glicose por um período de 40 minutos (com resolução temporal de 86 segundos). Estudos similares também foram realizados no cérebro humano (de Graaf et al., 2003).

Finalmente, após este estudo preliminar, optou-se por não utilizar qualquer abordagem que seguisse tal linha, pois ficou evidente que esta abordagem exigiria não só ajustes de *hardware* (como uma bobina dedicada de  $^{13}\text{C}$ ), mas também a administração de moléculas marcadas com o isótopo. Essas exigências iriam além dos recursos disponíveis para o projeto.

### **Transferência de Magnetização**

Uma outra metodologia para MRS dinâmica, descrita em (de Graaf, 2007), e que pode em princípio ser utilizada com qualquer átomo que apresente uma ressonância, é a chamada transferência de magnetização. Esta metodologia estuda processos químicos simples que podem ser descritos através de equilíbrios químicos, esquematizado na Equação 2.1, mas que também tenham uma dinâmica obrigatoriamente mais rápida que o tempo de relaxação do átomo em

questão.



Esta metodologia divide-se em três etapas principais: preparação, evolução e medida. Na etapa de preparação, uma sequência de pulsos é efetuada de forma a magnetizar um dos reagentes, por exemplo *A*. Em seguida a dinâmica química transcorre normalmente, o que resulta numa mistura de magnetização entre os reagentes: a magnetização das moléculas de *A* é transferida para *B* e vice-versa. Até que, quando for feita a medida, faz-se a aquisição do espectro e determina-se a constante ( $k_{AB}$ ) da dinâmica química. Resumidamente, a molécula é “magneticamente marcada”, e depois é efetuada a medida. Por isso, o processo todo deve ter duração menor que o tempo de relaxação do composto *A* ( $k_{AB} \gg \frac{1}{T_{1A}}$ ), para que a marcação não se perca. A SNR nesta técnica pode ser mantida em níveis satisfatórios, pois o experimento pode ser repetido diversas vezes sob condições idênticas (espera-se que a dinâmica de uma reação seja sempre a mesma para aquela reação). Isso permite a aquisição de vários espectros para um mesmo tempo de reação, que podem ser somados e processados da forma convencional.

Após esta pesquisa inicial, optou-se por não utilizar esta abordagem, pois pela própria posposta da técnica ela é restrita ao estudo de reações modeladas por equilíbrios químicos, as quais não se enquadravam nos interesses do trabalho.

## 2.1 *Functional Magnetic Resonance Spectroscopy*

As duas abordagens para aquisição de MRS dinâmica mostradas anteriormente na Seção anterior não se mostraram apropriadas ao projeto, por conseguinte os estudos voltaram-se para as técnicas de *functional Magnetic Resonance Spectroscopy* (fMRS).

Nos estudos de fMRS, assim como nos de *functional Magnetic Resonance Imaging* (fMRI), assume-se a hipótese de que a resposta a um dado estímulo será sempre a mesma. Consequentemente, a repetição do estímulo ou paradigma, cria um padrão que permite reconhecer, ao longo da aquisição, espectros correspondentes: estes representariam momentos idênticos em relação ao estímulo.

Durante o exame da bibliografia encontraram-se cerca de 18 publicações cujos trabalhos mais significativos foram realizados por Mangia et al., atualmente do *Center of Magnetic Resonance Research of University of Minnesota*, com 6 trabalhos. Porém seus estudos são, na maioria, feitos em equipamentos de ressonância de 7T. Nos demais trabalhos, podemos iden-

tificar diversos protocolos, a maioria feita em campos de  $1,5T$ , porém com conclusões que muitas vezes divergem.

Resumindo esses trabalhos, encontramos que a maioria usou:

- Campo magnético de  $1.5T$ ;
- Estímulo visual (geralmente, padrão xadrez radial piscando a  $8Hz$ );
- Somente indivíduos controles (ou seja, poucos estudaram patologias);
- No máximo 12 sujeitos (poucos usaram acima deste número);
- Bobina de cabeça (headcoil) padrão (alguns poucos usaram bobina de superfície);
- Aquisição de voxel único utilizando a sequência PRESS;
- Tempo de repetição (TR) de 1500 ou 2000ms;
- Tempo de eco (TE) de 135 – 6, 144, 270 – 2, ou 288ms (que são os valores de TE mais apropriados para a detecção de Lactato);
- Quantificação dos espectros utilizando o *software* LCModel (<http://s-provencher.com/pages/lcmodel.shtml>).

Estes parâmetros são interessantes para verificar que, em princípio, estudos desse tipo são factíveis em equipamentos como os disponíveis no programa *CInAPCe*. As Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3 mostram um sumário dos principais parâmetros utilizados nesses trabalhos, e dos principais resultados alcançados.

Artigo	Campo Magnético (T)	Bobina	Estímulo	Número de Sujeitos	
				Controles	Pacientes
Chiappa, Hill et al, 1999, <i>Epilepsia</i>	1,5	Cabeça / Superfície	Visual	12	9 epilepsia fotosensitiva +7 epilepsia
Zhu e Chen, 2001, <i>MRM</i>	4	Superfície	Visual	6	0
Mangia et al, 2003, <i>Neuroscience</i>	1,5	Cabeça	Visual	5	0
Urrila et al, 2003, <i>JCBFM</i>	1,5	Cabeça	Geração de palavras silenciosas	12	0
Urrila et al, 2004, <i>J Sleep Res</i>	1,5	Cabeça	Geração de palavras silenciosas	13 jovens +12 velhos	0
Boucard et al, 2005, <i>Eur Radiol</i>	1,5	Cabeça	Visual	4	0
Sarchielli et al, 2005, <i>Neuroimage</i>	1,5	Cabeça	Visual	10	22 enxaqueca com aura + 22 enxaqueca sem aura
Sandor et al, 2005, <i>Cephalalgia</i>	1,5	Cabeça	Visual	11	5 enxaqueca com aura + 5 enxaqueca com aura e outros sintomas
Mostert et al, 2005, <i>Eur Radiol</i>	1,5	Cabeça	Motor (mão)	6	0
Urrila et al, 2006, <i>Psych Res Neuroimag</i>	1,5	Cabeça	Visual	8	0
Maddock et al, 2006, <i>Psych Res Neuroimag</i>	1,5	Superfície	Visual com glicose intravenosa	6	0
Katz-Brull et al, 2006, <i>MRM</i>	3	Superfície	Visual	9	0
Baslow et al, 2007, <i>J Mol Neurosci</i>	3	Cabeça / Superfície	Visual	6	0
Mangia et al, 2007, <i>JCBFM</i>	7	Superfície	Visual	12	0
Mangia et al, 2007, <i>J Neurosci Res</i>	7	Superfície	Visual	12	0
Maddock et al, 2009, <i>Mol Psychiatry</i>	1,5	Superfície	Visual com teste de atenção	15	15 síndrome do pânico

Tabela 2.1: Sumário de parâmetros utilizados nos artigos revisados de fMRS.

Artigo	Protocolo de Aquisição			
		VOI	TR (ms)	TE (ms)
Chiappa, Hill et al, 1999, Epilepsia	single voxel, PRESS	Córtex occipital	2000	272
Zhu e Chen, 2001, MRM	single voxel 2x2x3cm3, PRESS		3000	23
Mangia et al, 2003, Neuroscience	single voxel, PRESS	Córtex visual	7500 a 15000	270
Urrila et al, 2003, JCBFM	single voxel	Área ativada	1500	288 e 144
Urrila et al, 2004, J Sleep Res	single voxel, PRESS	Área ativada	1500	288
Boucard et al, 2005, Eur Radiol	hybrid PRESS, 2D-CSI / single voxel	Córtex visual	1500	135
Sarchielli et al, 2005, Neuroimage	single voxel, PRESS	Córtex visual	2000	144
Sandor et al, 2005, Cephalalgia	MRSI	Córtex visual	1500	288
Mostert et al, 2005, Eur Radiol	hybrid PRESS, 2D-CSI	Área ativada	1500	135
Urrila et al, 2006, Psych Res Neuroimag				
Maddock et al, 2006, Psych Res Neuroimag	single voxel	Córtex visual	1500	288
Katz-Brull et al, 2006, MRM	single voxel, PRESS	Área ativada	2000	35
Baslow et al, 2007, J Mol Neurosci	single voxel, PRESS		2000	135
Mangia et al, 2007, JCBFM	single voxel, STEAM	Área ativada	5000	6
Mangia et al, 2007, J Neurosci Res	single voxel, STEAM	Área ativada	5000	6
Maddock et al, 2009, Mol Psychiatry	single voxel, PRESS		1500	288

Tabela 2.2: Sumário de parâmetros utilizados nos artigos revisados de fMRS (continuação da Tabela 2.1)

Artigo	Resultados
Chiappa, Hill et al, 1999, <i>Epilepsia</i>	aumento de Lac em pacientes vs controles no estado de repouso; nenhuma variação significativa de nenhum metabólito com estímulo
Zhu e Chen, 2001, <i>MRM</i>	aumento da altura do pico de NAA 2,5%, Cre 3,1%, H2O 3,1%; e diminuição da largura de linha de NAA -1,7%, Cre -1,8%, H2O -2,3%
Mangia et al, 2003, <i>Neuroscience</i>	diminuição de Lac 5s após estímulo, com aumento de Lac 12s após estímulo
Urrila et al, 2003, <i>JCBFM</i>	aumento de Lac 50% com estímulo
Urrila et al, 2004, <i>J Sleep Res</i>	aumento de Lac 40% em jovens durante estímulo, mas nenhum aumento em ninguém durante estado de privação de sono
Boucard et al, 2005, <i>Eur Radiol</i>	nenhuma variação significativa de nenhum metabólito com estímulo
Sarchielli et al, 2005, <i>Neuroimage</i>	diminuição de NAA durante estímulo para todos, acentuada (15%) nos pacientes com aura; leve aumento de Lac com estímulo, acentuado nos pacientes com aura
Sandor et al, 2005, <i>Cephalalgia</i>	aumento de Lac com estímulo em pacientes com aura e outros sintomas; alto Lac no estado de repouso (sem aumento com estímulo) em pacientes apenas com aura
Mostert et al, 2005, <i>Eur Radiol</i>	nenhuma variação significativa de nenhum metabólito com estímulo
Urrila et al, 2006, <i>Psych Res Neuroimag</i>	diminuição de NAA/H2O 7% e de Cho/H2O 12% para estado de privação do sono; nenhuma variação em estado alerta com estímulo; aumento de Cho/H2O com estímulo para estado de privação do sono
Maddock et al, 2006, <i>Psych Res Neuroimag</i>	aumento de Lac com estímulo
Katz-Brull et al, 2006, <i>MRM</i>	nenhuma variação significativa de nenhum metabólito com estímulo
Baslow et al, 2007, <i>J Mol Neurosci</i>	diminuição de NAA 13% com estímulo
Mangia et al, 2007, <i>JCBFM</i>	aumento de Lac 23% e Glu 3%, diminuição de Asp 15% com estímulo
Mangia et al, 2007, <i>J Neurosci Res</i>	aumento de Lac com estímulo
Maddock et al, 2009, <i>Mol Psychiatry</i>	aumento de Lac com estímulo, sendo maior para pacientes

Tabela 2.3: Sumário dos principais resultados alcançados nos artigos revisados de fMRS dos últimos 10 anos.

### 2.1.1 Abordagens experimentais

Nestes poucos artigos, identificamos basicamente três maneiras de adquirir dados dinâmicos, que chamamos de:

- Aquisição convencional;
- Aquisição progressiva;
- Aquisição de *MRSI* ou *CSI*.

#### Aquisição convencional

Neste tipo de aquisição, claramente derivada de experimentos de fMRI, a aquisição é feita sobre um único voxel. Foi amplamente utilizada nos trabalhos revisados, tanto nos que observaram variações funcionais (por exemplo (ZHU; CHEN, 2001) e (MANGIA et al., 2007b)), quanto nos experimentos que não observaram variações funcionais (por exemplo (BOUCARD et al., 2005) e (KATZ-BRULL et al., 2006)). Temporalmente, o experimento é dividido em pelo menos dois períodos ou blocos, geralmente correspondentes a duas tarefas cognitivas distintas: *On* para estímulo, ou execução de uma dada tarefa, e *Off* para a ausência do estímulo, ou repouso em relação à tarefa (*background*). Logo, em uma aquisição contínua é possível, durante o pós-processamento, correlacionar os espectros que pertencem ao mesmo tipo de bloco a fim de melhorar a *SNR* e permitir a comparação direta do estímulo com o *Background*.

#### Aquisição progressiva

Neste tipo de aquisição também feita sobre um único voxel e utilizada por Mangia *et al.* (MANGIA et al., 2003b) e (MANGIA et al., 2003a), a janela de aquisição varia em relação ao estímulo. Tendo sempre o estímulo como referência, a janela de aquisição é posicionada num determinado tempo posterior ao estímulo, o que permite a aquisição de diversos espectros correspondentes e melhorar a *SNR* daquele instante no tempo. Em seguida, mudando o atraso com que a aquisição é feita, os novos espectros corresponderão a um instante de tempo diferente. Dessa forma, variando o atrasos da aquisição é possível varrer todo o período que segue o estímulo.

### **Aquisição de MRSI ou CSI**

Este tipo de aquisição utiliza uma técnica conhecida como *Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging* ou *Chemical Shift Imaging*, que permite a aquisição simultânea de diferentes espectros em diferentes voxels e foi utilizada por Sandor *et al* em (SÁNDOR *et al.*, 2005). Logo, utilizando critérios anatômicos ou funcionais, é possível determinar quais voxels são correlacionados e assim aumentar a *SNR* espectral da região como um todo.

### **2.1.2 Dos artigos estudados**

Apesar das diferentes formas de aquisição discutidas, estas são apenas definições iniciais, que não serviriam para discussões mais profundas. De fato, mesmo os trabalhos que utilizam aquisições semelhantes divergem não só nos detalhes da aquisição, como TE, TR ou campo magnético, mas principalmente naquilo que se propõem a estudar. Sendo assim, abrem-se ainda mais critérios que poderiam ser utilizados para classificar estes trabalhos. Finalmente optou-se por catalogá-los segundo a natureza de cada estudo, na esperança de que este seja o caminho mais fértil para discussões:

- Estudos da bioquímica neuronal,
- Estudos de cognição,
- Estudos de patologia,
- Estudos com resultados negativos.

### **Estudos da bioquímica neuronal**

Nestes estudos, o principal objeto de investigação é a dinâmica bioquímica do cérebro. Neles enquadram-se a maioria dos trabalhos publicados ((ZHU; CHEN, 2001), (MANGIA *et al.*, 2003a), (MADDOCK *et al.*, 2006), (MANGIA *et al.*, 2006), (BASLOW; HRABE; GUILFOYLE, 2007), (MANGIA *et al.*, 2007b) e (MANGIA *et al.*, 2007a)), sendo que mais da metade foram realizados por Mangia *et al.*. A principal preocupação destes estudos está em determinar quais caminhos oxidativos são utilizados pelas diferentes células do sistema nervoso na obtenção de energia em condições consideradas normais. Por causa disso, são experimentos conduzidos apenas com sujeitos saudáveis.

A Glicose é usualmente considerada como a principal fonte de energia dos neurônios, mas diversas evidências *in vitro* e *in vivo* demonstram que outros metabólitos, como Lactato, Piru-

vato, Acetato, Glutamato e Glutamina, também podem ser oxidados para a obtenção de energia. Dentre estas substâncias o Lactato vem, recentemente, recebendo atenção por parte da comunidade científica, pois em alguns estudos observou-se que este metabólito pode ser oxidado tão eficientemente quanto a Glicose ou até mesmo apresentar vantagens sobre esta, uma vez que a transição de Lactato para Piruvato pode ser feita sem a necessidade de adenosinatrifosfato (ATP). Por causa disso muitos dos modelos atuais para a ativação neuronal já incluem o Lactato como parte essencial do processo ((PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994), (CERDÁN et al., 2006)), estimulando assim experimentos que tentam, de alguma forma, monitorar seus níveis nos locais de ativação.

No experimento descrito em (MADDOCK et al., 2006), realizado num campo de  $1,5T$  e uma bobina do tipo *headcoil*, os autores não só monitoraram os níveis metabólicos mas também controlaram os níveis glicêmicos do sangue. Neste estudo, as aquisições foram feitas de forma convencional com a comparação de blocos *On* e *Off*, mas também foram realizados dois ciclos de aquisição, um com os sujeitos em jejum e outro com a administração de Glicose intravenosa. Durante cada ciclo utilizou-se estímulos visuais compostos por um padrão xadrez piscando à frequência de  $8Hz$  para os blocos *On*, enquanto que para os blocos *Off* utilizou-se uma tela preta. A escolha do estímulo se baseou na resposta BOLD, pois em experimentos de *fMRI* este estímulo gera, além de uma resposta bem conhecida, uma resposta forte que não depende da interpretação do sujeito. As conclusões discutidas pelos autores apontam para um aumento dos níveis de Lactato durante o estímulo. Porém, não foi observada a correlação esperada com o nível glicêmico do sangue, pois ambos os ciclos apresentaram estatisticamente a mesma resposta.

Com esta mesma linha de pesquisa, encontramos os trabalhos publicados por Mangia et al., dois dos quais (MANGIA et al., 2003b) e (MANGIA et al., 2003a) foram realizados em campos de  $1,5T$  com aquisição progressiva, e os demais, (MANGIA et al., 2006), (MANGIA et al., 2007b) e (MANGIA et al., 2007a), realizados em campos de  $7T$  com aquisições convencionais. Todos os experimentos utilizaram estímulos visuais, pelos mesmos motivos citados anteriormente, mas não acrescentaram nenhuma outra variável ao experimento, atendo-se apenas à monitoração temporal dos metabólitos. Nos trabalhos realizados em campos de  $1,5T$  (MANGIA et al., 2003b), (MANGIA et al., 2003a), os autores observaram uma diminuição nos níveis de Lactato nos primeiros  $5s$  de aquisição, seguida por uma recuperação aos níveis iniciais em  $12s$ . Já nos trabalhos posteriores (MANGIA et al., 2006), (MANGIA et al., 2007b) e (MANGIA et al., 2007a), realizados em campos de  $7T$ , o que se observou foi um aumento de Glutamato, Aspartato e Lactato. Destaca-se que o aumento de Lactato neste caso não foi necessariamente uma contradição, pois em nenhum destes trabalhos obteve-se uma resolução

temporal igual à do trabalho feito no campo de 1,5T.

Juntamente com estes experimentos, este grupo de pesquisa também procura estudar os modelos energéticos para a ativação neuronal, em especial o modelo conhecido como *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle* (ANLS), introduzido em (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994) e o mais estudado atualmente (SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI, 2007), (CERDÁN et al., 2006). Para isso o grupo escreveu um artigo que resume (MANGIA et al., 2009a) os avanços no modelo, assim como, realizou simulações computacionais que tentam validar o modelo ANLS (MANGIA et al., 2009b).

Outro trabalho importante, (BASLOW; HRABE; GUILFOYLE, 2007), foi realizado com campo de 3T. Nele os autores observaram uma diminuição de 13% no sinal do metabólito N-Acetil-Aspartato, correlacionado a estímulos visuais de longa duração. Nestes experimentos, eles utilizaram aquisições convencionais muito semelhantes às realizadas nos trabalhos já citados, e concluíram que o N-Acetil-Aspartato funcionaria como uma bomba de água, a fim de manter o equilíbrio iônico no interior da célula, e por isso sua concentração deveria variar. No entanto, tão interessante quanto as conclusões realizadas, foi a discussão gerada pelas mesmas (MANGIA; TKAC, 2008), (BASLOW; HRABE; GUILFOYLE, 2007). Isso pois no experimento publicado em (MANGIA et al., 2007a), as variações encontradas de  $\pm 2\%$  para o metabólito NAA são atribuídas ao efeito BOLD (variação da suscetibilidade magnética local), e não a uma variação do metabólito, e embora existam diferenças experimentais argumenta-se que estas não deveriam influenciar o resultado a ponto de gerar duas conclusões tão divergentes.

### **Estudos de cognição**

Procurando investigar as respostas a estímulos mais complexos, os estudos de cognição procuram criar paradigmas que exijam níveis de consciência mais elevados que uma simples resposta sensorial inconsciente. Estes estudos também visavam entender os caminhos metabólicos em condições normais, e por isso foram utilizados apenas sujeitos normais.

Nos trabalhos (URRILA et al., 2003), (URRILA et al., 2004) e (URRILA et al., 2006), os autores adaptaram paradigmas do estudo de *silent words* existentes em fMRI para os experimentos de espectroscopia. Nestes experimentos a aquisição foi feita de forma convencional, e o estímulo visual utilizado serviu apenas como meio de interação com o sujeito. Tipicamente os períodos *On* caracterizavam-se por palavras projetadas na tela, enquanto que o *background* correspondia à projeção de números. Além disso, em (URRILA et al., 2004), além de monitorar as respostas referentes a cada bloco, procurou-se alguma correlação com a idade e também com o nível de atenção decorrente da privação de sono. Este último estudo sobre os níveis de atenção

durante a privação de sono, também foi realizado em (URRILA et al., 2006), porém não mais com a geração de palavras e sim com o mesmo estímulo visual simples já discutido (padrão xadrez piscando alternado com telas pretas).

As conclusões encontradas nestes trabalhos foram de que os níveis de Lactato aumentam durante o estímulo, mas somente nos sujeitos mais jovens. Por outro lado, as aquisições feitas durante a privação do sono também não apresentaram variações no nível de Lactato, nem mesmo em sujeitos jovens. Com relação aos outros metabólitos, os resultados de (URRILA et al., 2006) mostraram uma queda nos níveis de N-acetil-aspartato e Colina em indivíduos com privação de sono (independente do estímulo), mas também mostraram que durante o estímulo estes mesmos indivíduos apresentaram um aumento nos níveis de Colina.

### **Estudos de patologia**

Diferentemente dos estudos apresentados até aqui, este grupo de artigos procura identificar as alterações metabólicas que alguma patologia pode exercer sobre a dinâmica neuronal. Para tanto, estes estudos envolvem não só sujeitos normais como também sujeitos com alguma patologia diagnosticada.

Os exemplos encontrados foram os trabalhos (SÁNDOR et al., 2005) e (SARCHIELLI et al., 2005), que estudaram pacientes com enxaqueca. Em (SÁNDOR et al., 2005), aquisições de MRSI, feitas em  $1,5T$ , foram utilizadas para comparar a região anatomicamente atribuída ao processamento de estímulos visuais de controles e pacientes com enxaqueca com sintomas de aura visual. Já em (SARCHIELLI et al., 2005) foi utilizada uma aquisição convencional, também em  $1,5T$ . Em ambos estudos, os estímulos visuais foram utilizados não somente para definir os blocos do paradigma, mas também como estímulo à resposta patológica.

Os autores de ambos estudos concluíram que durante o estímulo os níveis de Lactato aumentam tanto em pacientes como controles, porém este aumento é muito mais acentuado nos pacientes. Em (SARCHIELLI et al., 2005), também constatou-se uma diminuição de N-acetil-aspartato para ambos os grupos, mas novamente, mais acentuada nos pacientes.

### **Estudos com resultados negativos**

Finalizando, discutimos exemplos de estudos que se enquadram em alguma das categorias anteriores, mas que não conseguiram detectar variações dinâmicas de nenhum metabólito durante períodos de estímulo.

Em (CHIAPPA et al., 1999) e (HILL et al., 1999) utilizou-se fMRS para comparar pa-

cientes com epilepsia fotossensível e não-fotossensível, com indivíduos controles. A aquisição convencional com campo de  $1,5T$  foi feita em paralelo com aquisições de eletroencefalograma (EEG), para que assim fosse possível monitorar a patologia por um método já estabelecido e que serviria de referência para a aquisição espectroscópica funcional. O estímulo visual utilizado, que foi um flash de luz com duração de 2s, serviu neste caso apenas como estímulo à resposta patológica, já que os blocos com espectros correspondentes foram determinados através da análise da resposta do EEG. Os resultados deste trabalho mostraram um aumento dos níveis de Lactato de pacientes com epilepsia fotossensível em relação aos de controles, porém não foi constatada nenhuma variação dinâmica (relacionada ao estímulo, ou à resposta do EEG) nos espectros medidos.

Além deste trabalho, outro grupo publicou 2 artigos, (BOUCARD et al., 2005) e (MOSTERT et al., 2005), em que se utilizaram aquisições convencionais e campo de  $1,5T$ , para avaliar a resposta metabólica a um estímulo visual e a uma tarefa motora respectivamente. Nenhum destes trabalhos conseguiu detectar variações dinâmicas nos espectros, sendo que em (BOUCARD et al., 2005), conclui-se ainda que as variações de Lactato reportadas em estudos similares provavelmente se deviam a artefatos de lipídios encontrados fora do volume de interesse.

Também em (KATZ-BRULL et al., 2006), onde se utilizaram aquisições convencionais com campo de  $3T$  e um estímulo visual, não foram reportadas variações dinâmicas de nenhum metabólito.

### **2.1.3 Comentários finais**

A partir desta breve revisão da literatura da área, observamos que a própria técnica de fMRS está longe de ser uma técnica robusta, pois mesmo os detalhes mais superficiais discutidos nos parágrafos anteriores ainda estão longe de serem um consenso. Identificamos trabalhos que, ao utilizarem a técnica, não encontraram nada, o que permite a especulação de que algumas das medidas feitas nos trabalhos com baixo campo possam ser apenas artefatos. Mas também encontramos trabalhos que, utilizando parâmetros experimentais equivalentes, encontraram resultados divergentes, o que reforça a necessidade de aprimorar a técnica, mesmo para campos mais altos.

## 2.2 Bioquímica Neuronal

Paralelamente aos estudos sobre as abordagens dinâmicas que poderiam ser utilizadas no trabalho, notou-se que, independente desta escolha, a técnica de espectroscopia trabalha com dados provenientes de um voxel de dimensões macroscópicas, sendo portanto afetada pelo chamado artefato de volume parcial. Este artefato, no que diz respeito à espectroscopia, expressa-se como uma média ponderada dos metabólitos provenientes dos diferentes tecidos ou até mesmo as células que compõem o volume de interesse, algo que, sem informações adicionais, esconde os valores individuais de cada tecido ou célula que compõem o voxel. Tentando contornar este problema, admitiu-se que independente dos diferentes tecidos compreendidos pelo voxel, sempre existirão neurônios contidos dentro dele e que estes são os principais responsáveis por qualquer mudança metabólica durante os experimentos funcionais.

A partir desta proposta, iniciou-se uma nova linha de estudos para entender como a dinâmica do micro, o neurônio, se mostraria através do macro, ou seja, das medidas de fMRS. Imediatamente constatou-se que a dinâmica envolvendo a ativação neuronal não seria restrita apenas ao neurônio, mas envolveria também as células em seu entorno, conhecidas como células da glia. Estas células desempenham o papel de apoio aos neurônios, fornecendo nutrientes, mantendo o equilíbrio homeostático, compondo a bainha de mielina e auxiliando nos processos sinápticos. Sua proporção varia ao longo de todo sistema nervoso, mas no caso do córtex cerebral é de 3,72:1 (60,84 bilhões de glia; 16,34 bilhões de neurônios). Segundo a literatura estudada, o principal modelo para descrever o processo de ativação neuronal envolveria a célula da glia conhecida como astrócito, e juntos eles seriam os principais responsáveis pela variação metabólica decorrente de uma atividade sináptica.

### 2.2.1 O modelo *Astrocyte to Neuron Lactate shuttle* (ANLS)

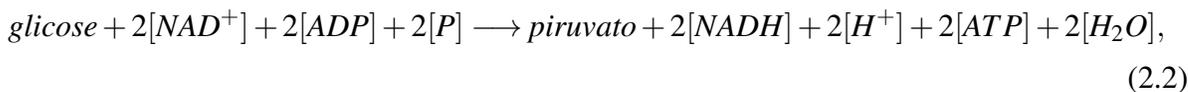
Este modelo denominado *Astrocyte to Neuron Lactate shuttle* (ANLS) foi inicialmente proposto por Luc Pellerin e Pierre J. Magistretti em 1994 (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994), e hoje direciona os experimentos de MRS que investigam o assunto. A dinâmica proposta por eles baseia-se na hipótese de que não só os neurônios mas os astrócitos estão intimamente ligados ao processo de ativação. Ela inicia-se com a liberação do neurotransmissor Glutamato na sinapse, fazendo com que o estímulo possa ser transmitido ao neurônio seguinte. Isto, segundo os autores, caracteriza uma ativação neuronal e é o precursor das respostas fisiológicas observadas.

Embora não seja o único neurotransmissor conhecido, o Glutamato é, definitivamente, o

de maior importância. Além de ser o principal neurotransmissor excitatório de resposta rápida, também é encontrado nas sinapses plásticas, as quais se modificam em intensidade e são associadas à tarefas cognitivas como memória e aprendizado. Sendo assim é o neurotransmissor mais abundante no sistema nervoso de vertebrados, estando presente em 90% das sinapses, e é parte essencial no modelo proposto por Pellerin e Magistretti.

Como comentado anteriormente, o processo de ativação inicia-se com a liberação do Glutamato na sinapse, o que satura toda a região sináptica e propicia a absorção de Glutamato pelos receptores pós-sinápticos. Ao mesmo tempo, o sistema deve garantir que o neurotransmissor seja rapidamente retirado da sinapse a fim de permitir uma dinâmica rápida na transmissão do pulso. Para tanto os autores, recorrendo a medidas feitas em astrócitos *in vitro*, argumentam que como a parede celular do astrócito possui uma grande quantidade de transportadores de Glutamato, isso favoreceria a transposição do Glutamato para seu meio intracelular. No entanto, o transporte do Glutamato também faz com que íons de  $Na^+$  entrem no meio intracelular do astrócito a uma razão de uma molécula de Glutamato para três íons de  $Na^+$ . Isto causa um desequilíbrio iônico na membrana do astrócito que estimula as bombas de  $Na/K$ , as quais consomem *ATP*.

Inicia-se assim o processo ativo que irá resultar no consumo de glicose pelo astrócito, decorrente de uma ativação neuronal. O *ATP* consumido pela bomba de  $Na/K$  deve ser rapidamente repostado, e por isso tanto o ciclo *TCA*<sup>1</sup> quanto a glicólise são estimulados<sup>2</sup>. Este processo fará com que a glicose seja transformada em piruvato:



onde  $NAD^+$  é o estado oxidado da nicotinamida adenina dinucleotídeo e *NADH* seu estado reduzido.

Paralelamente os autores argumentam que o Glutamato absorvido pelo astrócito deve ser transformado em Glutamina, pois nesta forma o aminoácido não caracteriza um neurotransmissor; isto permitiria seu transporte até o neurônio passando pelo meio extracelular. Já dentro do neurônio a Glutamina pode ser transformada novamente em Glutamato para a reutilização como neurotransmissor. Este processo de biosíntese da Glutamina a partir do Glutamato demanda o

---

<sup>1</sup>Também conhecido como ciclo de Krebs, é a principal forma de oxidação e obtenção de *ATP*

<sup>2</sup>Tanto a ação das bombas de  $Na/K$ , o ciclo *TCA* e a glicólise são processos contínuos que fazem parte do metabolismo basal de uma célula, porém neste texto enfatiza-se apenas os processos relacionados a ativação neuronal e por tanto que diferem do nível basal.

consumo de mais um *ATP*, que seria provido pela mesma reação de glicólise mencionada, fechando o balanço estequiométrico.

Observa-se que nesta primeira parte do processo a demanda energética inicial devido à absorção e subsequente metabolização do Glutamato propiciam um consumo de *ATP* que vai além da capacidade de síntese deste pelo Ciclo *TCA*, por isso, a glicólise predominaria como fonte de *ATP*. Porém como vemos na Equação 2.2, o processo de glicólise também produz piruvato, que em condições aeróbicas é utilizado no ciclo *TCA*, ou em condições anaeróbicas na produção de Lactato.

Finalmente, nas primeiras propostas dos autores, o astrócito não sendo capaz de metabolizar todo o piruvato, converteria o excedente em Lactato, o qual seria disponibilizado ao neurônio. Este último iria utilizar o Lactato disponível para convertê-lo em piruvato para utilizá-lo na oxidação convencional do ciclo *TCA*, e inibindo o aumento no consumo ou absorção de glicose no neurônio.

No entanto, Pellerin e Magistretti não esclarecem muitos dos motivos que levariam a esta dinâmica metabólica, principalmente os mecanismos que originariam a preferência do neurônio pelo Lactato na obtenção de energia.

### **A hipótese *Redox-Switch/Redox-Coupling***

Em 2006, Cerdán propôs que o processo de glicólise no astrócito descrito no *ANLs* irá favorecer a via anaeróbica e gerar Lactato não pela falta de oxigênio mas sim pelo equilíbrio da coenzima  $NAD^+/NADH$ . Ele relembra que com a glicólise o equilíbrio pende a favor do aumento de  $NAD^+$  e a diminuição de  $NADH$  enquanto que a biosíntese de Lactato a partir de piruvato faz com que a concentração de  $NAD^+$  diminua e a de  $NADH$  aumente:



Com isso, o excesso de piruvato no astrócito que se formou durante a glicólise da primeira etapa, seria transformado em Lactato para contribuir com o equilíbrio  $NAD^+/NADH$  citado. Este Lactato formado seria transportado para o meio extracelular por difusão simples e, da mesma forma, difundido para dentro do neurônio aumentando os níveis de Lactato dentro deste. Este excesso de Lactato dentro do neurônio irá promover a mesma reação mostrada na Equação 2.3, mas no sentido da síntese do piruvato. Com isso, os níveis de piruvato dentro do neurônio aumentariam à medida que o  $NADH$  é oxidado em  $NAD^+$ , fator que, como mostrado na Equação 2.2, desfavorece o consumo de glicose no neurônio e fornece piruvato para as vias

energéticas aeróbicas do ciclo *TCA*.

Finalmente, devemos observar que esta mesma inibição no processo de glicólise descrita para o neurônio, também poderia ocorrer em astrócitos. Nessas condições, o excedente de Lactato e piruvato extracelular seriam consumidos aerobicamente pelo neurônio e astrócito até que os níveis pré-ativação fossem alcançados, reiniciando o ciclo. Isto caracterizaria formas de auto regulamentação da atividade glicolítica de cada célula.

### 2.2.2 Experimentos

Consistente com o modelo apresentado na Seção 2.2.1 encontramos uma série de experimentos. Como exemplo podemos citar os experimentos feitos em roedores por Nehlig et al. (NEHLIG; WITTENDORP-RECHENMANN; LAM, 2004), que mostram uma igual absorção de [ $^{14}C$ ]2 – *deoxyglucose* para neurônios ou astrócitos. Temos também os estudos in vitro de Loaiza et al. (LOAIZA; PORRAS; BARROS, 2003) que observaram um aumento na absorção de glicose em astrócitos na presença de Glutamato, ao mesmo tempo que Porras et al (PORRAS; LOAIZA; BARROS, 2004) observaram uma diminuição para os neurônios. Finalmente, a distribuição de alguns dos transportadores de Lactato na parede dos astrócitos apontam para uma preferência dos neurônios em metabolizar Lactato (LOVATT et al., 2007); paralelamente, quando isolados estes mesmos astrócitos produzem uma grande quantidade de Lactato.

Quanto à utilização do Lactato por parte dos neurônios, muito dos experimentos são inconclusivos. Embora já se tenha observado que o consumo de Lactato possa ser maior que o de glicose, Bak et al. (BAK et al., 2006) observaram que quando expostos a N-metil-D-aspartato (conhecido por induzir a despolarização de membrana), apenas o consumo de glicose apresenta um aumento, algo também observado em (RAMÍREZ et al., 2007), que não apontaram qualquer preferência dos neurônios pelo Lactato, e em concordância com (BLISS; SAPOLSKY, 2001), que só observaram tal preferência quando as concentrações de Lactato disponíveis eram várias vezes superiores à de glicose.

Esta dificuldade em definir a dinâmica da glicose pode ser atribuída a variações durante a preparação da amostra, uma vez que não se pode garantir, num ambiente in vitro, o mesmo equilíbrio de membrana que no ambiente in vivo. Sendo assim, o uso de células in vitro para determinar seu comportamento in vivo é questionável (DIENEL; CRUZ, 2004), e põe em cheque a credibilidade da argumentação a favor do modelo.

### 2.2.3 Simulações

Outra abordagem encontrada para o estudo do metabolismo da ativação neuronal foi o desenvolvimento de modelagens computacionais, baseadas no *ANLS*, que permitiriam casar medidas indiretas, porém mais próximas da realidade *in vivo*, com aquilo que o modelo prevê. Um exemplo são as medidas macroscópicas de espectroscopia, cuja resolução não permite isolar uma dezena de células, mas sim milhares, e portanto seus dados experimentais não representam o comportamento individual das células mas sim um comportamento médio destas.

Identificaram-se apenas dois estudos, cada qual com uma abordagem distinta. No primeiro, desenvolvido por Simpson et al (SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI, 2007) e revisada em (MANGIA et al., 2009b), a modelagem ateu-se as características fisiológicas do tecido cerebral, mais especificamente do córtex cerebral, estudando as possíveis vias para a distribuição de nutrientes no tecido.

#### Modelagem de Simpson et al

Nesta modelagem os autores acompanharam a variação das concentrações de glicose e Lactato ao longo de uma região que representaria um cortex cerebral “médio”. Criaram-se compartimentos representando a luz do capilar, o endotélio do vaso, a lâmina basal do tecido neuronal, o astrócito, o meio intersticial e o neurônio, mostrados na Figura 2.1. Com os estudos disponíveis na literatura sobre a distribuição e eficiência dos transportadores de membrana, esquematizados na Figura 2.2, os autores determinaram a permeabilidade das diversas membranas a cada metabólito, para assim modelar a dinâmica de transporte entre os compartimentos. Além disso, a modelagem também prevê a difusão dos metabólitos no meio intersticial. Todos esses caminhos estão representados na Figura 2.1.

Finalmente, o metabolismo celular é modelado introduzindo-se mais três caminhos, em cada uma das células: um representaria o consumo de glicose que não resulta na produção de Lactato, o

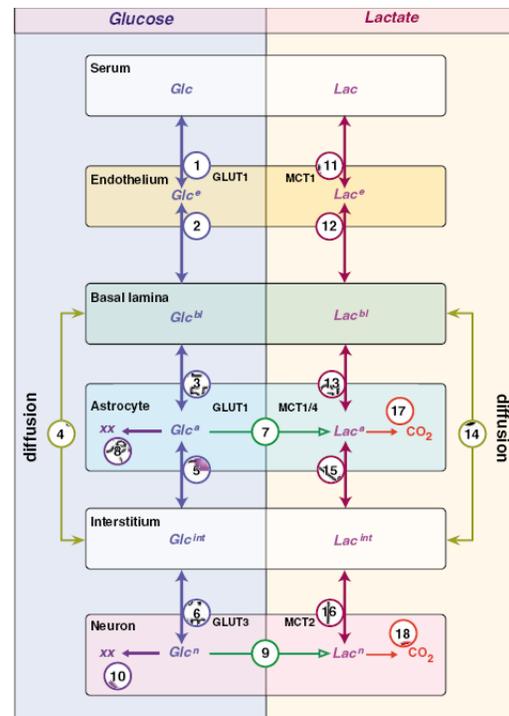


Figura 2.1: Compartimentos para simulação feita em (SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI, 2007).

## 2.2 Bioquímica Neuronal

segundo o consumo de Lactato, e o terceiro a taxa com que a glicose é transformada em Lactato. No entanto, estes últimos caminhos que modelam o metabolismo celular foram extremamente simplificados. Os autores escolheram adotar o modelo de Michelis-Menten para resumir toda a dinâmica celular, e assim acompanhar os produtos finais da dinâmica.

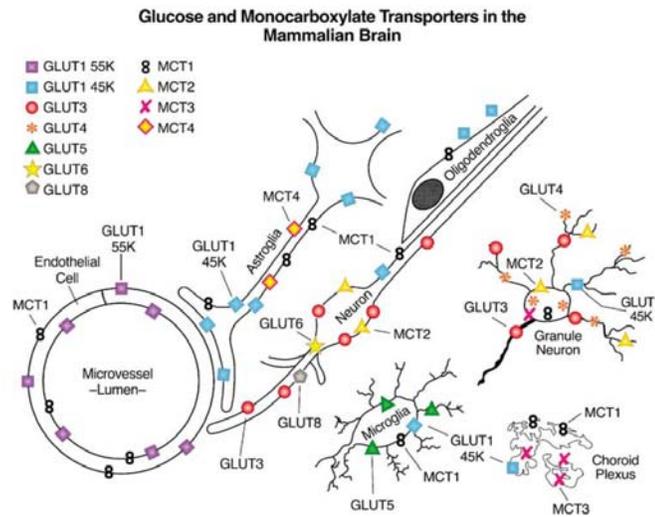
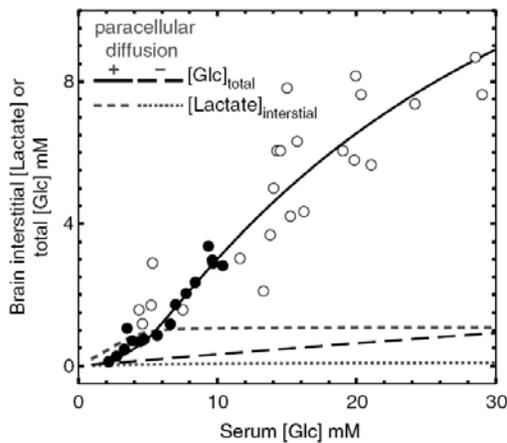
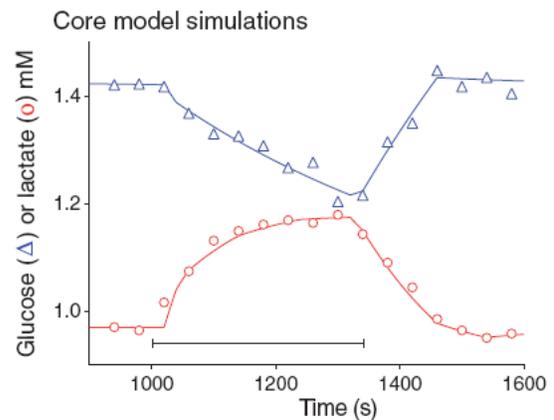


Figura 2.2: Representação das posições dos transportadores metabólicos ao longo da membrana celular.

De qualquer forma, a primeira simulação foi capaz de modelar os níveis de Lactato e Glicose durante um estado basal, atingindo um equilíbrio metabólico coerente para as medidas experimentais mostradas na Figura 2.3. Na segunda simulação introduziu-se um estímulo neuronal, que consistia num aumento de 1,4 vezes do consumo de Lactato no neurônio por 25 segundos, e um aumento de 4,3 vezes a glicólise no astrócito e neurônio por 45 segundos.



(a) Figura adaptada de (SIMPSON; CAR-RUTHERS; VANNUCCI, 2007)

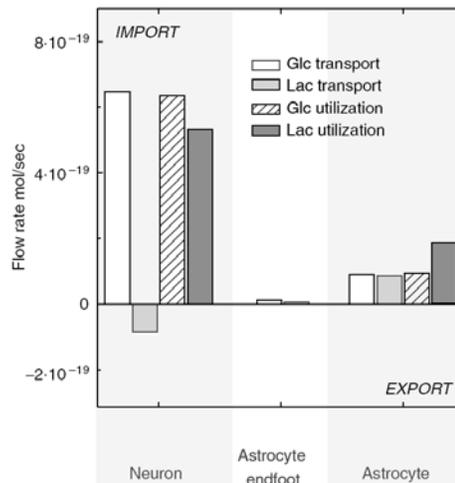


(b) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b)

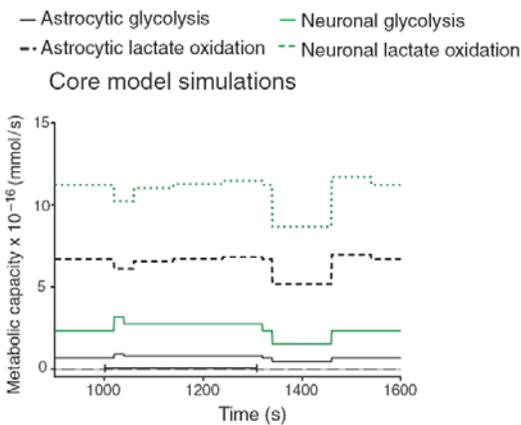
Figura 2.3: Ajuste da simulação a dados encontrados na literatura.

Esta simulação mostrou que a difusão direta de nutrientes do capilar para o meio intersticial

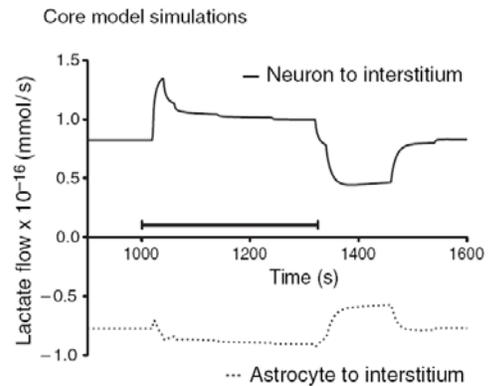
é essencial, algo que aumentaria o raio de influência de uma ativação sobre as células vizinhas. Porém o fato mais significativo apontado pelas simulações foram as taxas de transportes encontradas. No estado basal a Figura 2.4(a) mostra que o neurônio se comporta como um exportador de Lactato, ao invés do astrócito, que por sua vez, consome o Lactato disponibilizado no interstício pelo neurônio. Durante o estímulo, mostrado na Figura 2.4(b), as taxas de transporte mostradas na Figura 2.4(c) mostram que em nenhum momento o sentido do fluxo de Lactato muda para nenhuma das células.



(a) Figura adaptada de (SIMPSON; CAR-RUTHERS; VANNUCCI, 2007): fluxo metabólico



(b) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b): capacidade metabólica

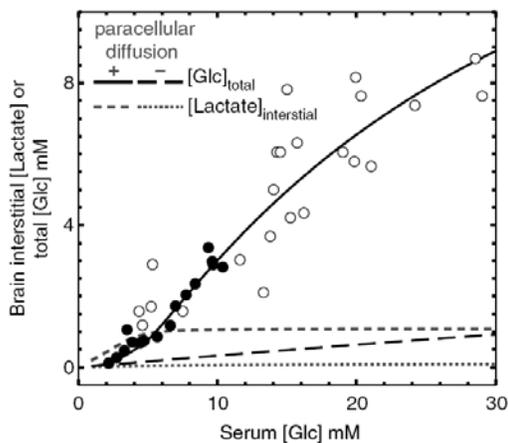


(c) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b): fluxo de Lactato

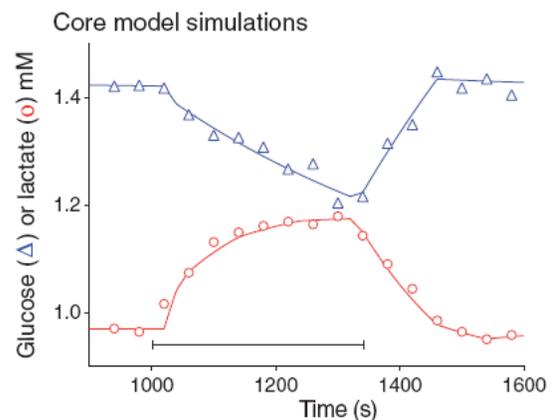
Figura 2.4: Resultados da simulação sem a hipótese ANLS.

Numa terceira simulação os autores testaram outra hipótese proposta por Pellerin e Magistretti, que impõe a preferência do neurônio pelo Lactato na obtenção de energia durante um estímulo. Para tanto, Simpson e al impuseram que o consumo de glicose do neurônio não deveria variar nem durante nem depois do estímulo, o que implica que as alterações no con-

sumo energético devido ao estímulo deviam ficar restritos ao consumo de Lactato. O resultado desta simulação mostrou que sob tais condições a concordância com os dados experimentais só é possível se a capacidade de transporte de glicose do astrócito for aumentada em 12 vezes em relação à encontrada na literatura. O novo estado basal é mostrado na Figura 2.6(a), onde identificamos as modificações necessárias para satisfazer os dados experimentais mostrados na Figura 2.5. A Figura 2.6(b) mostra o estímulo neuronal, e a Figura 2.6(c) mostra o transporte de Lactato durante a simulação. Com isso vemos que estas condições proporcionam uma resposta coerente com o modelo *ANLS*, onde o neurônio importa o Lactato disponibilizado no interstício pelo astrócito.



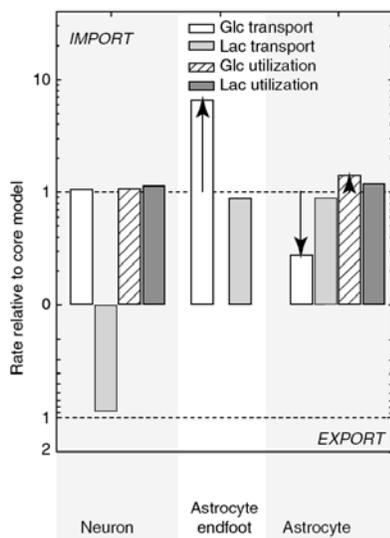
(a) Figura adaptada de (SIMPSON; CAR-RUTHERS; VANNUCCI, 2007)



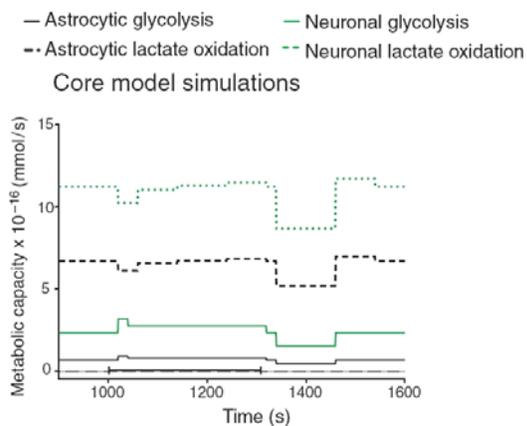
(b) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b)

Figura 2.5: Ajuste da simulação impondo a hipótese *ANLS*.

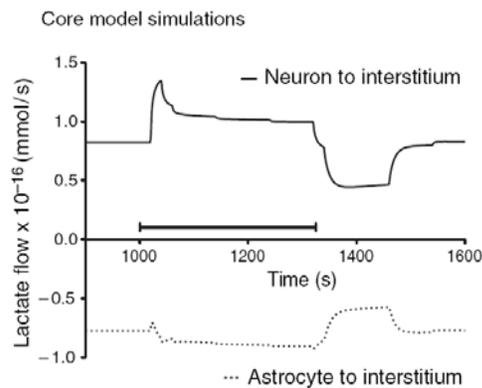
Conclui-se com esses resultados que ao utilizar os valores para o transporte metabólito de membrana reportados na literatura, as mudanças na concentração de Lactato durante um estímulo prolongado são inconsistentes com o *ANLS*. De fato como o neurônio é quem exporta o Lactato para o consumo do astrócito, isto caracteriza uma inversão de papéis: *neuron to astrocyte Lactate shuttle (NALS)*. Para viabilizar o *ANLS* é necessário limitar o consumo de glicose do neurônio (não reportado na literatura) e aumentar arbitrariamente a capacidade de transporte de glicose do astrócito em 12 vezes com relação aos valores reportados na literatura. No entanto, deve-se ressaltar que estas conclusões não excluem o modelo *ANLS* em condições fisiológicas distintas, principalmente se considerarmos as propostas feitas em (CERDÁN et al., 2006) apresentadas na Seção 2.2.1, que não excluem a dinâmica inversa encontrada nesta modelagem.



(a) Figura adaptada de (SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI, 2007):  
fluxo metabólico



(b) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b):  
capacidade metabólica



(c) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2009b):  
fluxo de Lactato

Figura 2.6: Resultados da simulação com a hipótese ANLS.

### Modelagem de Aubert, Pellerin, Magistretti e Costalat

No modelo discutido na seção anterior os autores não abordam a dinâmica celular, preferindo simplificá-la utilizando o modelo de Michaelis-Menten, e preocupando-se apenas com a modelagem do transporte de nutrientes através das diversas membranas que separam as células da luz do capilar. Todavia, um outro modelo proposto em (AUBERT et al., 2007) descarta este formalismo fisiológico, ao mesmo tempo que se aprofunda nos mecanismos metabólicos da célula.

O esquema do modelo é mostrado na Figura 2.7, onde as linhas cheias aplicam-se a uma condição *in vitro* que pode ser transportada para a condição *in vivo* se acrescido das linhas pontilhadas. O modelo descreve a evolução das concentrações de *ATP*, piruvato, Lactato e *NADH*, tanto no citoplasma do neurônio (índice *n*) quanto do astrócito (índice *g*), e as concentrações de Lactato no meio intersticial.

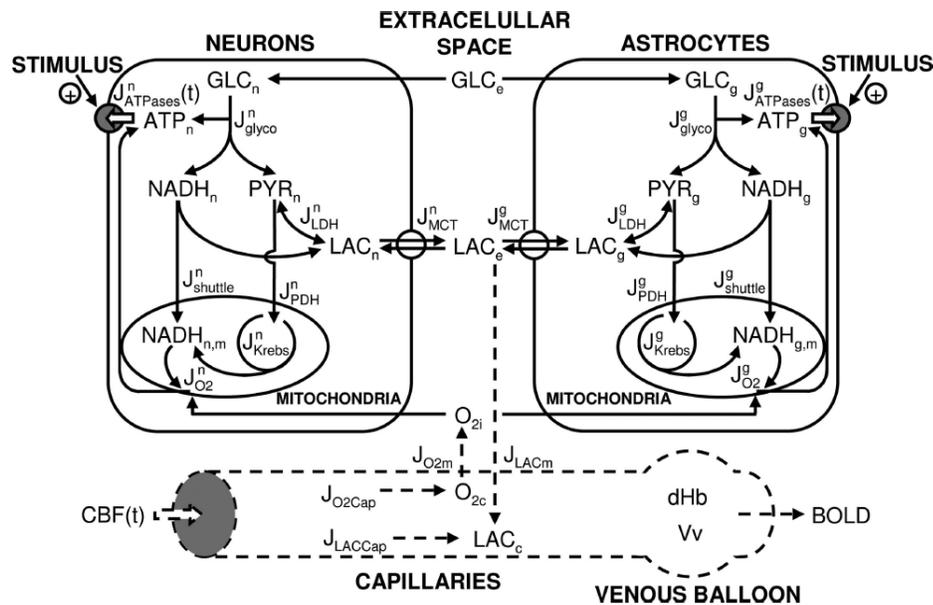
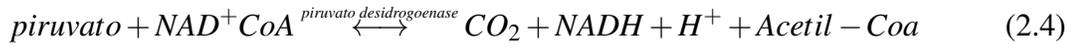


Figura 2.7: Representação para simulação feita em (AUBERT et al., 2007).

A concentração de *ATP* no citoplasma, em qualquer uma das células, depende proporcionalmente a taxa de glicólise ( $J_{glyco}$ ) (Equação 2.2), e do ciclo de Krebs, este último um processo aeróbico e por isso diretamente associado ao consumo de oxigênio pela mitocôndria ( $J_{O_2}$ ). Por outro lado essa concentração diminui à medida que o *ATP* é consumido para a produção de energia, e isso é representado pela taxa da enzima que cataliza a decomposição do *ATP*, a *ATPase* ( $J_{ATPase}$ ).

Já a concentração de piruvato no citoplasma das células aumenta com a glicólise, em uma proporção de duas moléculas de piruvato para uma de glicose ( $J_{glyco}$ ) (Equação 2.2), e diminui

devido a piruvato-desidrogenase ( $J_{PDH}$ ) (Equação 2.4), que transforma o piruvato em Acetil-CoA para consumo no ciclo de Krebs na mitocôndria, e devido à Lactato-desidrogenase ( $J_{LDH}$ ) (Equação 2.3), que transforma o piruvato em Lactato.



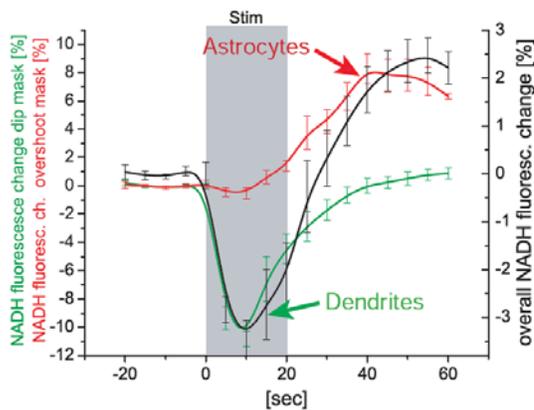
Finalmente a concentração da forma reduzida da coenzima dinucleótido de nicotinamida-adenina ou  $\text{NADH}$  no citoplasma do neurônio e astrócito aumenta com a glicólise ( $J_{glyco}$ ) (Equação 2.2), ao passo que diminui com a Lactato-desidrogenase ( $J_{LDH}$ ) (Equação 2.3) e com a taxa do acoplamento malato-aspartato ( $J_{Shuttle}$ ), que transfere a forma reduzida da coenzima para o interior da mitocôndria e a forma oxidada  $\text{NAD}^+$  para o exterior.

Definida a dinâmica entre estes três metabólitos encontrados no citoplasma, define-se a concentração de Lactato no citoplasma, que é igual à diferença entre o produzido pela Lactato-desidrogenase ( $J_{LDH}$ ) (Equação 2.3) e o Lactato transportado para o exterior da célula ( $J_{MCT}$ ). Já a concentração de Lactato fora da célula é a soma das taxas com que o Lactato é exportado de ambas as células ( $J_{MCT}$ ), corrigido por um fator de difusão do Lactato fora da célula.

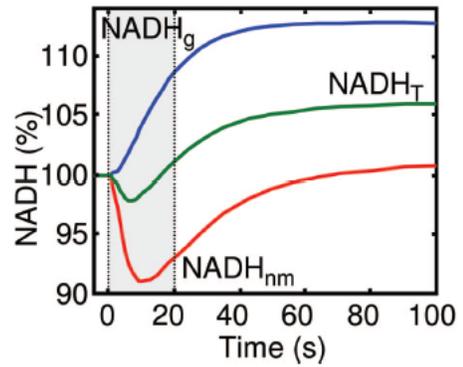
Com isso o modelo está pronto para descrever a dinâmica celular em um ambiente in vitro. De fato, o modelo é coerente com os dados publicados por Kasischke et al (KASISCHKE et al., 2004) mostrados na Figura 2.8, e com inúmeros trabalhos de espectroscopia, os quais são discutidos na Seção 2, que mediram o aumento de Lactato no tecido ( $LAC_T$ ) em decorrência de uma ativação neuronal. Além disso, alguns trabalhos, como (HU; WILSON, 1997), que estudou ratos, e (MANGIA et al., 2003a), que estudou sujeitos saudáveis, mostraram uma queda inicial do Lactato no tecido ( $LAC_T$ ), mostrado na Figura 2.9. Nota-se que nenhum destes trabalhos usou um estímulo de 20s, como o da modelagem aqui discutida.

Nos gráficos da Figura 2.10 acompanhamos a dinâmica simulada pelo modelo. Neles identificamos, na Figura 2.10(a), que a taxa de glicólise ( $J_{glyco}$ ) irá aumentar para ambas as células, porém em maior intensidade no astrócito ( $J_{glyco}^g$ ). Por outro lado a variação no consumo de oxigênio não segue esta mesma tendência mostrando que o metabolismo aeróbico do astrócito altera-se muito menos que o do neurônio. Na Figura 2.10(b), vemos que tanto a taxa de Lactato-desidrogenase ( $J_{LDH}^g$ ) quanto o fluxo de transporte de Lactato para o exterior ( $J_{MCT}^g$ ) do astrócito aumentam; já para o neurônio ( $J_{LDH}^g$ ) e ( $J_{MCT}^g$ ) diminuem, indicando claramente o acoplamento descrito no ANLS.

Uma segunda simulação foi realizada aprimorando a dinâmica do Lactato e oxigênio extracelular. Adicionou-se um terceiro compartimento (linhas tracejadas da Figura 2.7) represen-

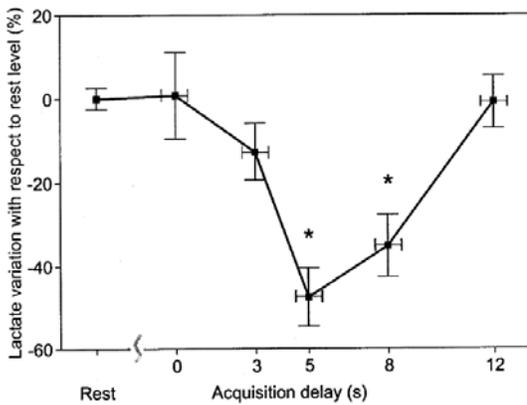


(a) Figura adaptada de (KASISCHKE et al., 2004)

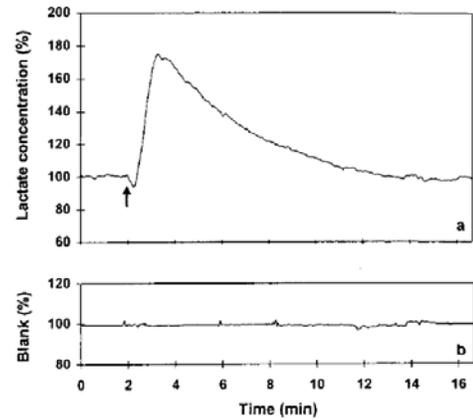


(b) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)

Figura 2.8: Ajuste da simulação a dados da literatura.

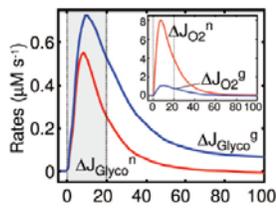


(a) Figura adaptada de (MANGIA et al., 2003a)

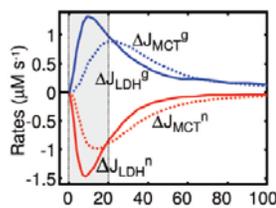


(b) Figura adaptada de (HU; WILSON, 1997)

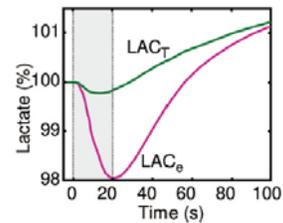
Figura 2.9: Ajuste da simulação a dados da literatura.



(a) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)



(b) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)



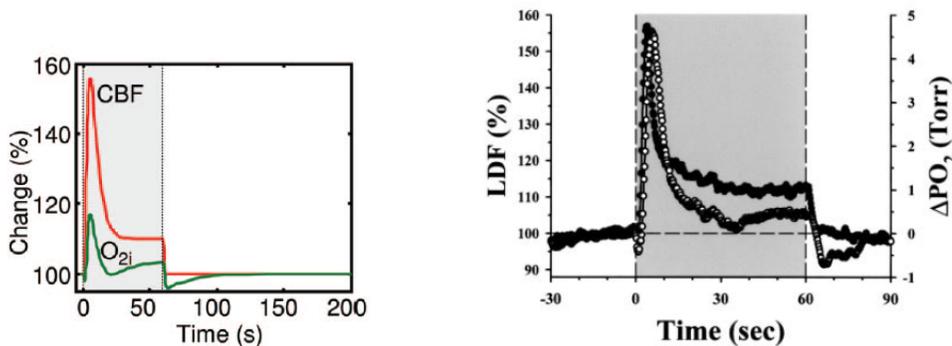
(c) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)

Figura 2.10: Resultados da simulação.

## 2.3 Conclusões

tando o capilar e fazendo com que o modelo descrevesse um ambiente *in vivo*. Neste compartimento tanto a concentração de oxigênio quanto de Lactato derivam da diferença entre a taxa com que o sangue entrega esses metabólitos ( $J_{O_2Cap}$  e  $J_{LACCap}$ ) e a difusão dos metabólitos para o tecido ( $J_{O_2m}$  e  $J_{LACm}$ ). Finalmente, a taxa com que o sangue é capaz de entregar os metabólitos irá depender diretamente do fluxo sanguíneo cerebral ( $CBF$ ) no capilar, descrito em (ANCES et al., 2001) e que pode ser acoplado ao modelo do balão de Buxton et al. (BUXTON; WONG; FRANK, 1998). Incluindo também as grandezas de volume venoso ( $V_v$ ) e a concentração de desoxiemoglobina ( $dHb$ ), os autores, ao utilizar o modelo do balão, acoplam a simulação *in vitro* para a ativação neuronal com a medida macroscópica *in vivo* do efeito BOLD.

Sendo assim, o novo modelo não só fica capaz de modelar a dinâmica metabólica visível com os experimentos de MRS, como também o efeito BOLD observado nos experimentos de fMRI. Na Figura 2.11, podemos observar o resultado da simulação com os dados apresentados em (ANCES et al., 2001) do CBF e a concentração de oxigênio no meio intersticial. Observamos também nas Figuras 2.12 um comportamento semelhante ao observado na simulação anterior, que como discutido, suporta o ANLS.



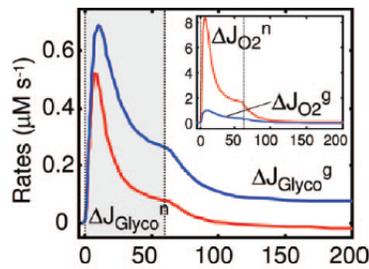
(a) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)

(b) Figura adaptada de (ANCES et al., 2001)

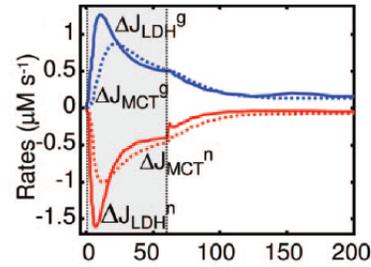
Figura 2.11: Resultados da simulação.

## 2.3 Conclusões

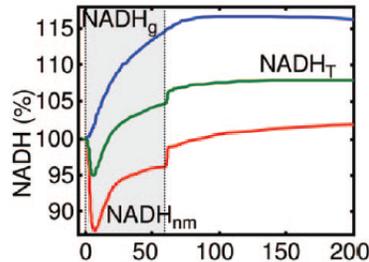
Com os estudos aqui descritos, ficou claro que as medidas macroscópicas de fMRS são fruto das mudanças a nível celular que acontecem durante uma ativação. Nota-se também que, apesar de divergentes, os experimentos e modelos computacionais focam-se em alguns metabólitos chave como Lactato e Glutamato. Portanto, os metabólitos escolhidos para serem monitorados nos experimentos realizados foram:



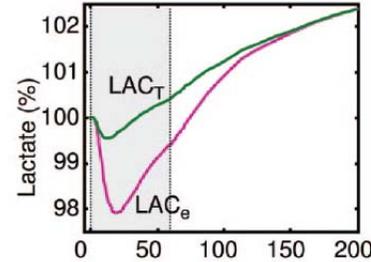
(a) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)



(b) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)



(c) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)



(d) Figura adaptada de (AUBERT et al., 2007)

Figura 2.12: Resultados da simulação com a hipótese ANLS.

- Lactato (Lac): fortemente relacionado ao metabolismo celular. A maioria dos trabalhos encontrados de fMRS apontou um aumento nos níveis deste metabólito associado ao estímulo.
- Grupo Glutamato/Glutamina (Glx): soma das concentrações de Glutamato e Glutamina que devido à proximidade dos picos correspondentes no espectro não podem ser separados. Como mencionado, o Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e portanto é liberado na fenda sináptica em decorrência de uma ativação neuronal. O trabalho (MANGIA et al., 2007a) apontou um aumento deste metabólito associado ao estímulo.
- Creatina + Fosfocreatina (Cre): metabólitos cujos picos se sobrepõem e que são usualmente monitorados via MRS, possuem relação com a cadeia energética da célula (AUBERT; COSTALAT, 2005), (AUBERT et al., 2007). Nenhum trabalho encontrou variações na concentração deste metabólito associadas ao estímulo, no entanto, (ZHU; CHEN, 2001) aponta uma variação do pico em  $3.03\text{ ppm}$  associada ao efeito BOLD (depois aparentemente confirmada por (MANGIA et al., 2007b)).
- Glicerofosfocolina + Fosfocolina (Cho): metabólitos cujos picos se sobrepõem e que são usualmente monitorados via MRS. Apenas o trabalho (URRILA et al., 2006) encontrou variações na concentração deste metabólito relativa ao pico de água (Cho/H<sub>2</sub>O) associadas ao estímulo, mas trata-se de um trabalho muito específico realizado com indivíduos

deprivados de sono.

- N-acetil-aspartato + ácido N-acetilglutâmico (NAA): metabólitos cujos picos se sobrepõem e que são usualmente monitorados via MRS. (ZHU; CHEN, 2001) aponta uma variação pequena do pico em 2,01 *ppm* associada ao efeito BOLD (assumida como tal em (MANGIA et al., 2007b)). Como comentado na Seção 2.1.2, a variação temporal da concentração deste metabólito em decorrência de um estímulo foi defendida por (BASLOW; HRABE; GUILFOYLE, 2007) e retrucada por (MANGIA; TKAC, 2008).

## 3 *Experimentos realizados*

Nos capítulos anteriores, resumimos todos os estudos nos quais este trabalho se baseou. Neste capítulo, descrevemos os experimentos realizados, iniciando com os equipamentos disponíveis, passando pela sequência de pulsos e parâmetros de aquisição utilizados, e terminando com uma descrição dos paradigmas testados.

### 3.1 Protocolos de aquisição e paradigma

#### 3.1.1 Hardware

Os protocolos de aquisição desenvolvidos tiveram como base os protocolos encontrados na literatura discutida na Seção 2. Nestes observamos que a maioria dos experimentos foi realizada em um campo magnético de  $1.5T$  com bobinas de cabeça *Headcoil*.

Em nossos experimentos, o *hardware* disponível, um equipamento Philips Achieva, permitiu realizar os experimentos em um campo magnético de  $3T$ , o que deveria contribuir para um aumento na qualidade dos dados em relação aos trabalhos que usaram  $1,5T$ . A bobina utilizada foi um bobina de cabeça de 8 canais (*Headcoil SENSE 8*) (Figura 3.1).



Figura 3.1: Bobina *Headcoil*.

#### 3.1.2 Sequência de pulsos

A sequência de pulsos mais utilizada nos trabalhos pesquisados (Seção 2.1) e também adotada em nossos experimentos foi a sequência PRESS, já que teoricamente tem SNR duas vezes

maior que a STEAM (Figura 3.2). Os tempos de repetição (TR) utilizados na maioria dos trabalhos de fMRS estudados variaram entre  $1500ms$  ou  $2000ms$ , ambos tempos longos que reduzem a contribuição das macromoléculas ao sinal medido. Com o intuito inicial de aumentar ao máximo a resolução temporal, nos primeiros experimentos realizados utilizamos um TR de  $1500ms$ . Já nos últimos experimentos, ao notar que para obter resultados iniciais era necessário uma resolução temporal mais baixa, utilizamos um TR de  $2000ms$ , com o objetivo de aumentar a SNR do sinal medido

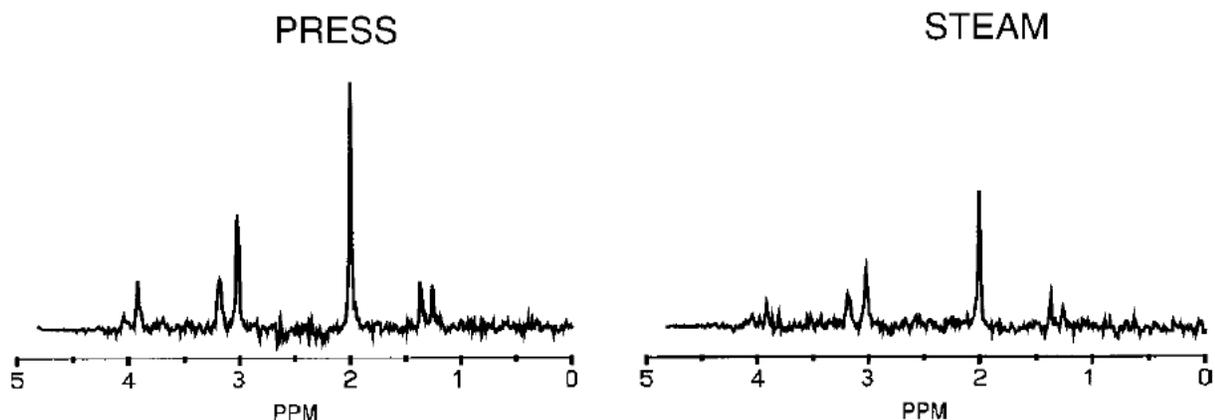


Figura 3.2: Comparação entre espectros obtidos com PRESS e STEAM.

Quanto ao tempo de eco (TE) utilizado, os trabalhos da literatura apresentaram uma variedade maior, com valores de variando entre:  $136ms$ ,  $144ms$ ,  $272ms$  ou  $288ms$ . Isto porque cada um destes tempos está intimamente ligado ao campo magnético no qual é feito o estudo, e também ao metabólito que se deseja observar.

Já nos artigos estudados notou-se que o Lactato seria o metabólito de interesse com a pior razão sinal ruído e, de fato, as primeiras aquisições apontaram para a mesma conclusão. Logo o TE escolhido foi de  $288ms$ , otimizando a aquisição para a sua detecção em um campo de 3T (PHILIPS, 2008).

#### 3.1.3 NSA e phase-cycling

NSA (*Number of Spectral Averages*) é um parâmetro que determina o número de aquisições feitas pela máquina que irão compor uma média que resulta no espectro medido. Embora o número ideal para a aquisição dinâmica devesse ser um, o que garantiria a melhor resolução temporal factível pelo aparelho, a SNR dos experimentos não permite. Além disso estas médias das aquisições permitem fazer o chamado *phase-cycling* que são aquisições defasadas entre si (Equações 1.10 e 1.11). Com isto é possível eliminar a componente DC dos sinais medidos que

são decorrente das diferenças físicas entre as bobinas seja eliminada sem prejudicar o sinal.

Em nossos experimentos usamos NSA igual ao número de ciclos de fase, que foi 2 nos primeiros experimentos (experimento curto) e 8 nos últimos (experimento longo).

#### 3.1.4 Estímulo e volume de interesse

O estímulo utilizado nos experimentos foi o mesmo utilizado na maioria dos trabalhos da área (ver Seção 2). Este consiste de um estímulo visual composto por um padrão xadrez radial (Figura 3.3) que pisca com uma frequência de  $8Hz$ . Este estímulo gera uma resposta neuronal que é amplamente conhecida e é independente da “vontade” do indivíduo. Além disso, esta resposta fica isolada à região do córtex occipital ou córtex visual.

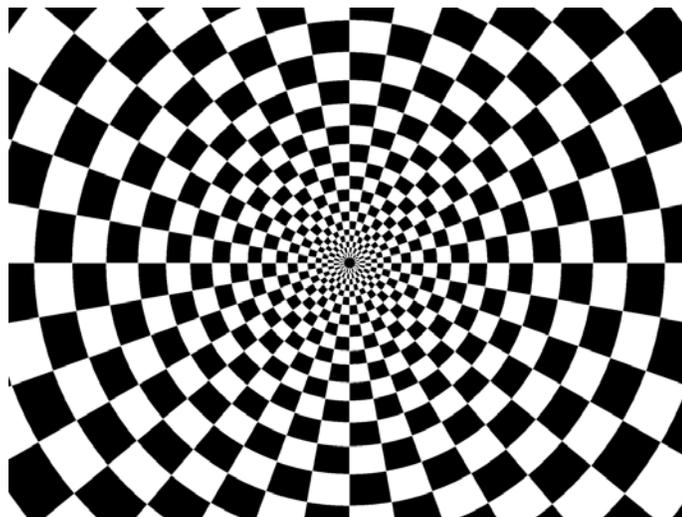


Figura 3.3: Imagem utilizada com estímulo visual.

Nos experimentos realizados, utilizamos este estímulo visual, e consequentemente posicionamos o voxel sobre o córtex occipital para uma aquisição *single voxel*.

#### 3.1.5 Paradigmas

Em experimentos funcionais, “paradigma” é a sequência temporal de eventos de estímulo (ou tarefa cognitiva) e repouso. Nos trabalhos estudados não encontramos nenhum paradigma padrão, pois trata-se do principal “parâmetro” que define as características de um estudo funcional.

Nos experimentos realizados, foram propostos e testados vários paradigmas, mas somente dois foram completamente formalizados e sistematicamente analisados. O primeiro paradigma, mais curto, constitui-se de 7 blocos *Off* alternados com 7 blocos *On* de estímulo, cada um com

duração de *1min* (Figura 3.4(a)). O segundo paradigma, mais longo, constitui-se de um bloco inicial de *Baseline* de *5,3min*, seguido por um bloco *On* de *10,7min* e um bloco *Off* de *10,7min* (Figura 3.4(b)).

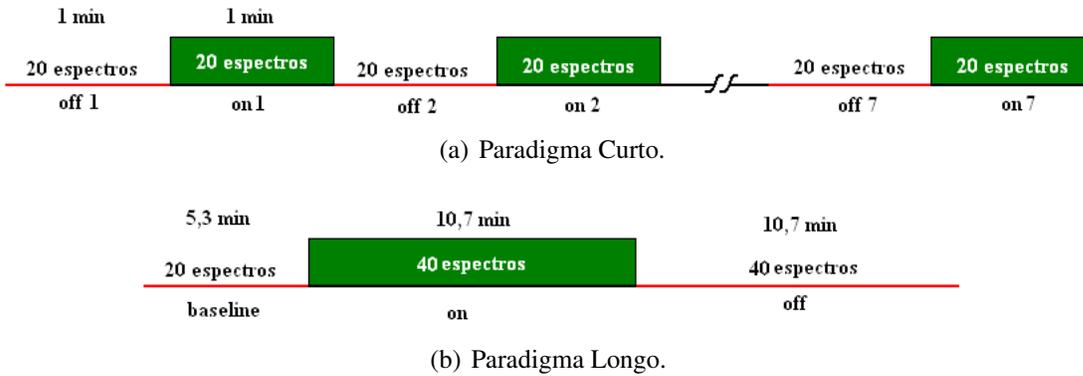


Figura 3.4: Paradigmas utilizados no trabalho.

## 3.2 Aquisição

A aquisição dos dados foi feita em uma das máquinas de Ressonância Magnética Achieva 3T da Philips, que compõem o projeto CInAPCe. Os dados foram todos obtidos de indivíduos saudáveis, que eram posicionados sobre a maca na posição de decúbito dorsal<sup>1</sup>. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unicamp (protocolo CEP No 321/2008, C.A.A.E. 0254.0.146.00-08). As aquisições foram feitas com uma bobina do tipo *Headcoil* (Figura 3.1). Junto com a bobina era posicionado o equipamento para estímulo conhecido como Eloquence (Figura 3.5(a)). Este equipamento é especialmente desenvolvido para estudos funcionais e é composto por um monitor LCD controlado remotamente por um terminal de computador, cuja imagem, através de um jogo de espelhos, é projetada no campo de visão do indivíduo. Além disso, o sistema também dispõe de um teclado (Figura 3.5(b)) especializado, que foi utilizado em alguns experimentos para o acompanhamento do nível de atenção dos indivíduos.

<sup>1</sup>Deitado de barriga para cima.



(a) Sistema Eloquence



(b) Teclado Eloquence.

Figura 3.5: Sistema para aquisição de fMRS.

## 3.2 Aquisição

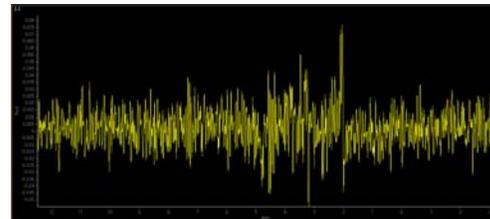
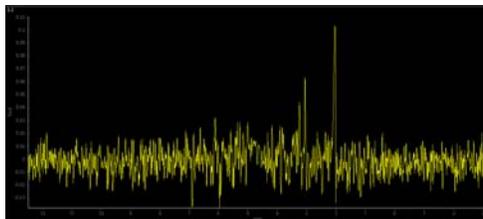
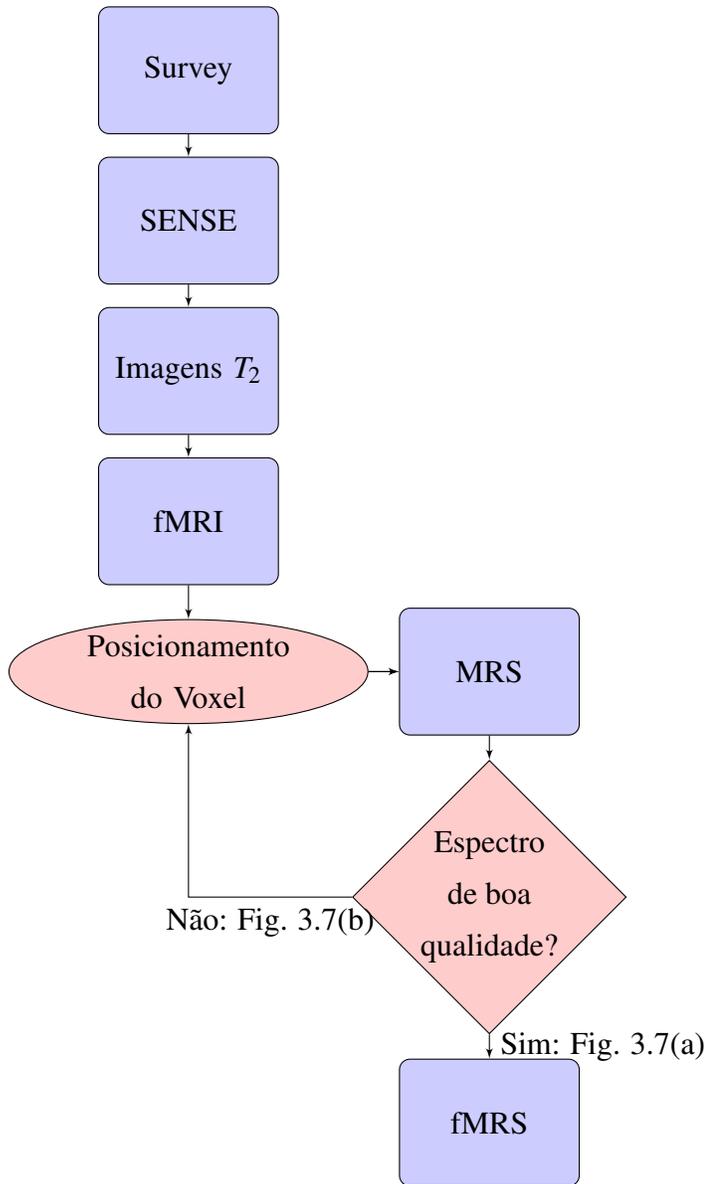
---

Após o posicionamento do indivíduo e do Eloquence (Figura 3.6), a maca pode ser deslizada para dentro da máquina para realizar a aquisição. A aquisição consistia, de fato, numa sequência de aquisições de referência e preparação, para então finalmente realizar a aquisição dos dados de fMRS propriamente ditos. Estas aquisições eram:



Figura 3.6: Posicionamento de indivíduo.

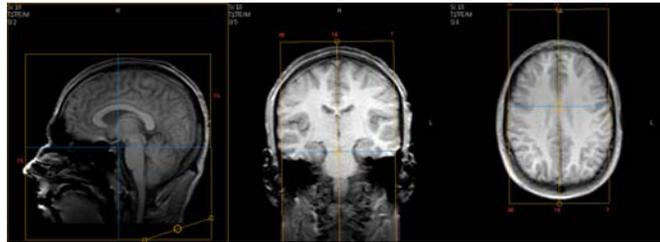
1. Survey: aquisição rápida de imagens com baixa resolução espacial, usadas como primeira referência de posicionamento;
2. Referência SENSE: aquisição para calibração dos canais de aquisição via método SENSE;
3. Aquisição de imagens anatômicas ponderadas em T2 nos três planos (axial, coronal e sagital), para posicionamento do voxel segundo critérios anatômicos (Figura 3.8(a));
4. Aquisição de fMRI usando o mesmo estímulo visual de fMRS: imagens para posicionamento do voxel de fMRS segundo critérios funcionais (Figura 3.8(b)) ;
5. Posicionamento do voxel de fMRS: procedimento manual feito a partir das imagens obtidas em 3 e 4 (Figura 3.8(c));
6. Aquisição de MRS de preparação: Calibração de referência da água para utilização na sequência CHESS de supressão deste sinal (Figura 3.8(d)), e aquisição de um espectro para avaliação da SNR (Figuras 3.7(a) e 3.7(b));
7. Experimento de fMRS.



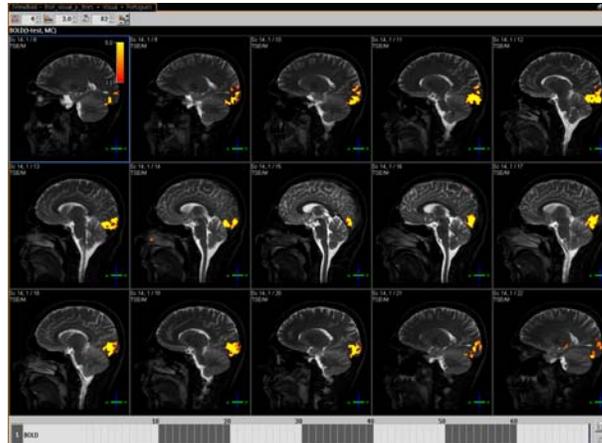
(a) Espectro de preparação de boa qualidade.

(b) Espectro de preparação sem qualidade.

Figura 3.7: Exemplos de aquisição para avaliação da SNR



(a) Imagens T2 para determinar cortes de aquisição.



(b) fMRI sobreposto numa imagem anatômica.



(c) Posicionamento do voxel para aquisição de MRS.



(d) Otimização da frequência da água para pulso CHESS.

Figura 3.8: Imagens obtidas durante as aquisições de referência e preparação

## 3.3 Pós-processamento

Feita a aquisição os dados eram exportados para que pudessem ser processados. Porém o formato dos dados consiste nos espectros concatenados, logo foram desenvolvidas rotinas no software Matlab para quebrar a sequência de espectros nos diversos blocos do paradigma. Além disso, devido ao grande volume de dados, também foram desenvolvidas rotinas para alinhamento, apodização e deslocamento (*shift*) dos espectros de forma automatizada. Finalmente, foram desenvolvidas rotinas para a transformação dos dados para os formatos dos *softwares* jMRUI e LCModel, utilizados para a visualização e quantificação dos dados.

### 3.3.1 Leitura dos dados e aplicação dos paradigmas

Os dados fornecidos pela máquina consistem em um arquivo “.SPAR” e um “.SDAT”. O primeiro é um arquivo de texto onde encontramos os parâmetros de aquisição assim como a codificação para interpretação dos dados contidos no “.SDAT”. Portanto a rotina desenvolvida lê os parâmetros e decodifica os dados, transformando-os em variáveis do Matlab.

Em seguida estes dados podem ser separados nos blocos que compõem o paradigma. Para tanto, uma rotina utiliza um *input* que descreve o paradigma e rotula os grupos de espectros definidos no paradigma como *On* ou *Off*.

### 3.3.2 Ferramentas de processamento

Estas rotinas foram desenvolvidas para pré-processar os espectros antes da quantificação. Incluem desde as rotinas que fazem a média dos espectros correlacionados, como também rotinas que apodizam e alinham o sinal.

As rotinas que fazem a média de diversos espectros compreendem desde a média simples entre estes espectros de mesma posição em relação ao estímulo, até a média dos espectros dentro de um mesmo bloco. Existe também a rotina denominada Janela que faz a média dentro de um dinâmico de tamanho determinado pelo usuário, que varre a sequência de espectros, semelhante a um processo de convolução. Outra rotina denominada Grupo faz a média dos espectros dentro de um grupo determinado, mas neste caso o grupo é fechado e não permite que um mesmo espectro esteja presente em mais de um grupo.

Também foi desenvolvida a rotina de ECC (*Eddy Currents Correction*) que mede a fase do espectro de referência da água, adquirido no início do experimento, e usa este valor para corrigir a fase dos espectros medidos subtraindo a fase do espectro de referência dos demais medidos.

A rotina de apodização faz com que o FID seja multiplicado por uma exponencial decrescente linear ou quadrática, o que equivale a filtrar as frequências mais altas no espaço de espectros por uma gaussiana ou lorentziana respectivamente. Dessa forma as frequências mais altas são eliminadas.

A rotina de alinhamento identifica o pico espectral do NAA e associa o valor de 2,01 ppm para este pico. Este é um procedimento padrão em espectroscopia in vivo e garante o alinhamento da escala para todos os espectros.

A rotina de *shift* correlaciona o pico do NAA de dois espectros diferentes e move ciclicamente o primeiro espectros em relação ao segundo para garantir o alinhamento entre eles.

#### 3.3.3 Formato dos dados

O processo de escrita dos espectros que serão quantificados depende diretamente do *software* onde se deseja fazer a quantificação dos espectros, por isso foram criadas duas rotinas, cada qual com um software em mente. Na primeira, desenvolvida para ser usada com o software jMRUI, os espectros podiam ser escritos de forma concatenada em um arquivo texto na forma de uma tabela ASCII. Sendo assim, a rotina cria um cabeçalho contendo a informação descrita no “.SPAR” seguida pelos dados em formato ASCII. Para identificar o final de cada espectro, são adicionados marcadores antes de cada seção da tabela definindo o nome do espectro. Com isso, nossa rotina é capaz de escrever tanto os blocos em arquivos separados como estes concatenados em um único arquivo.

Já o formato compatível com o LCModel deve escrever cada espectro em um arquivo independente, já que o LCModel só abre um espectro por vez. Por isso a rotina pega o conjunto de espectros, seja ele de um bloco ou a aquisição completa, e cria um arquivo para cada espectro. Este arquivo contém um cabeçalho com as informações da aquisição contidas no “.SPAR ” e seu nome é quem define sua posição com relação à aquisição.

#### 3.3.4 Quantificação

A quantificação dos espectros podia ser feita em qualquer um dos dois softwares já citados, jMRUI ou LCModel. Inicialmente utilizamos o software jMRUI, que por ser aberto já estava disponível para uso desde o início do projeto. Neste software encontramos tanto os métodos AMARES quanto QUEST discutidos em 1.2.5, porém experiências e trabalhos desenvolvidos pelo grupo apontaram uma preferência pelo método AMARES.

Logo nas primeiras tentativas utilizou-se o método AMARES do jMRUI. No entanto, a disponibilização do uso do *software* LCModel permitiu comparar ambos os métodos, e segundo os testes não houve grande disparidade entre ambos. Porém por ser o LCModel totalmente automatizado, ao passo que o AMARES é manual, e principalmente por ser utilizado na maioria dos trabalhos revisados, o método AMARES foi substituído pelo LCModel nos testes subsequentes e nos experimentos realizados.

O LCModel calcula o chamado *Cramér-Rao lower bound* (CRLB), parâmetro que fornece uma medida da confiabilidade das estimativas feitas sobre um conjunto de parâmetros (CAVASSILA et al., 2001). O LCModel fornece este parâmetro na forma de um erro percentual em relação ao valor estimado para a quantificação. Neste trabalho optou-se por descartar as quantificações que tiveram valores de CRLB superiores a 30%, o que equivale a uma SNR  $\leq 3$ .

## 3.4 Experimentos realizados

Ao longo da pesquisa, foram propostos e testados nove diferentes protocolos experimentais. No entanto a maioria destes protocolos mostrou falhas logo após as primeiras aquisições, sendo portanto descartados. Aqui apresentamos apenas os resultados de três dos protocolos experimentais testados, que foram aqueles realizados com um maior número de sujeitos, e que inicialmente nos pareceram adequados para verificar as variações metabólicas procuradas.

### 3.4.1 Experimento Curto

Foi o primeiro experimento desenvolvido e dele participaram 16 indivíduos, sendo que os dados de apenas 13 puderam ser efetivamente usados nas análises. O paradigma escolhido foi o paradigma curto que consistia em 7 blocos *Off* alternados com 7 blocos *On*, cada um com duração de 1 min, começando com um bloco *Off* e perfazendo um total de 14 minutos. Cada bloco continha 20 espectros obtidos com NSA de 2 e fases alternadas por phase cycling.

A sequência de aquisição utilizada foi a sequência PRESS, com TR de 1500ms e TE de 288ms, a fim de reduzir o sinal dos lipídios e favorecer a detecção do metabólito Lactato. Optou-se por uma aquisição *single voxel* de tamanho  $2 \times 2 \times 2\text{cm}^3$  posicionado no meio do córtex occipital (Figura 3.9), com base na ativação por fMRI feita anteriormente. Utilizou-se um estímulo visual composto pelo padrão xadrez radial piscando com frequência de 8Hz.

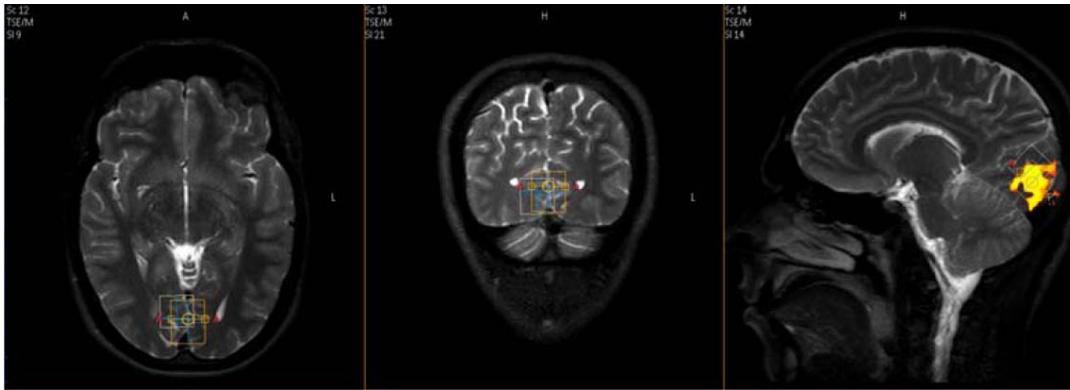


Figura 3.9: Posicionamento do voxel utilizado nos Experimentos Curto e Longo.

#### 3.4.2 Experimento Longo

Desenvolvido após o Experimento Curto para estudar outras hipóteses, teve a participação de 19 indivíduos, cujos dados de apenas 16 puderam ser efetivamente usados nas análises. Além disso, para cada dia de aquisição foi realizado uma medida com um phantom desenvolvido para espectroscopia *in vivo* (Tabela 3.1) sobre as mesmas condições experimentais, porém apesar de terem sido realizadas 11 aquisições com o phantom apenas 8 puderam ser usadas, devido à degradação do phantom nas últimas aquisições.



Figura 3.10: Phantom1

O paradigma escolhido foi o paradigma longo que consistia em um bloco de *Baseline* com duração de 5,3 minutos seguido por um bloco *On* em um *Off* de 10,7 minutos cada, perfazendo um total de 26,7 minutos. O bloco de *Baseline* é composto por 20 espectros e os blocos *On* e *Off* por 40 espectros, cada espectro obtido com NSA de 8 e fases alternadas por phase cycling.

A sequência de aquisição utilizada foi a PRESS, com TR de 2000ms e TE de 288ms, a fim de reduzir o sinal dos lipídios e favorecer a detecção do metabólito Lactato. Optou-se por uma aquisição single voxel de tamanho  $2 \times 2 \times 2\text{cm}^3$  com o voxel posicionado no centro do córtex occipital. O estímulo escolhido foi visual composto pelo padrão xadrez radial piscando com

Phantom1	
metabólito	concentração ( $m\frac{mol}{L}$ )
NAA	0,36
NAAG	1,17
Cre	1,38
M-Ino	0,83
Ala	0,21
Glu	0,75
Asp	0,83
Azida de sódio	0,015

Tabela 3.1: Concentrações molares do Phantom1, fabricado em 19/10/2009

frequência de  $8Hz$ . No entanto, com o tempo prolongado do experimento, muitos indivíduos tiveram dificuldade em manterem-se acordados. Para contornar este problema os indivíduos foram instruídos a apertar um botão no teclado do Eloquence (Figura 3.5(b)) toda vez que uma cruz vermelha aparecia no centro da imagem de estímulo. Esta cruz por ter um período aleatório tenta tornar a tarefa mais interativa na esperança de deixar o experimento menos entediante para os indivíduos.

### 3.4.3 Experimento Longo Modificado

Após uma revisão dos parâmetros e a chegada do phantom oficial do projeto CInAPCe (Tabela 3.2) o experimento longo foi modificado.



Figura 3.11: Phantom CInAPCe

O Experimento Longo Modificado contou com a participação de 18 indivíduos, cujos dados de apenas 17 puderam ser efetivamente usados nas análises. Das 8 aquisições com o novo

### 3.4 Experimentos realizados

Phantom CInAPCe	
metabólito	concentração ( $m\frac{mol}{L}$ )
NAA	10
Cre	8
Cho	3
Lac	1
M-Ino	6
Glu	10
Gln	5
DSS	2
$Na_2HPO_4$	72
$NaCOOH$	200
$NaH_2PO_4$	28
Azida de sódio	1,54

Tabela 3.2: Concentrações molares do Phantom CInAPCe, fabricado em 25/11/2009

phantom as 2 primeiras tiveram que ser descartadas, pois inicialmente o mesmo estava sendo guardado numa geladeira, o que alterou a posição dos picos no espectro. O paradigma, estímulo, sequência de aquisição, TR e TE, e tamanho do voxel, foram mantidos os mesmos que para o experimento anterior: paradigma com 1 bloco de *Baseline* de 5,3 minutos (20 espectros, NSA = 8), um *On* e um *Off* de 10,7 minutos cada (40 espectros, NSA = 8); estímulo visual (padrão xadrez radial piscando a 8Hz); sequência PRESS; TR de 2000ms e TE de 288ms; voxel de  $2 \times 2 \times 2cm^3$ .

A principal mudança neste experimento foi no posicionamento do voxel. Diferentemente dos experimentos anteriores, onde o voxel tinha sido posicionado bem na parte central do cortex occipital, neste ele foi posicionado no hemisfério direito do córtex occipital (Figura 3.12), de modo a evitar o líquido presente na fissura longitudinal. Neste experimento também utilizou-se o teclado do Eloquence para monitoração do nível de atenção do indivíduo já descrito.



Figura 3.12: Posicionamento do voxel utilizado no Experimentos Longo Modificado.

## 4 Análise e resultados

Nos gráficos apresentados neste capítulo cada ponto representa a média de um conjunto determinado de valores encontrados pelo LCMModel para cada metabólito e indivíduo ou phantom, porém valores de CRLB maiores que 30% não foram considerados nesta média, o que faz com que em alguns casos não tenhamos um conjunto suficiente de valores para compor a média (tipicamente pelo menos metade dos valores iniciais). As barras de erro nos gráficos representam a variância do conjunto de valores que compuseram a média.

### 4.1 Experimento Curto

Quando este experimento foi realizado muitas das rotinas de análise ainda estavam em desenvolvimento e por isso apenas abordagens mais simplificadas foram utilizadas no processamento. Uma delas, denominada ONvsOFF\_Blocos (Figura 4.1), consistiu em fazer, para cada indivíduo, a média dos espectros de cada bloco *On* e *Off*. Isso resultou em 7 espectros *Off* e alternados com 7 espectros *On* para cada indivíduo. Fizemos a quantificação dos 14 espectros de cada indivíduo utilizando o LCMModel e em seguida promediamos os valores quantificados sobre os indivíduos. Esses resultados estão mostrados no gráfico da Figura 4.2. Nesse gráfico, as abscissas mostram o bloco correspondente, e as ordenadas mostram valores promediados das concentrações absolutas fornecidas pelo LCMModel, em unidades arbitrárias.

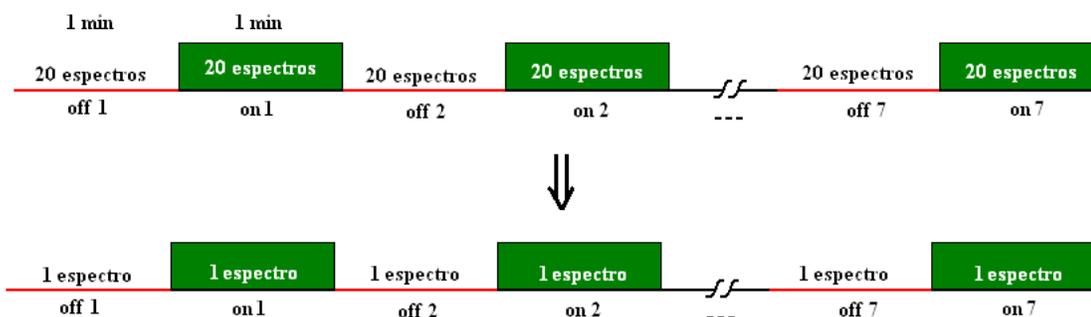


Figura 4.1: Esquema da análise ONvsOFF\_Blocos do Experimento Curto.

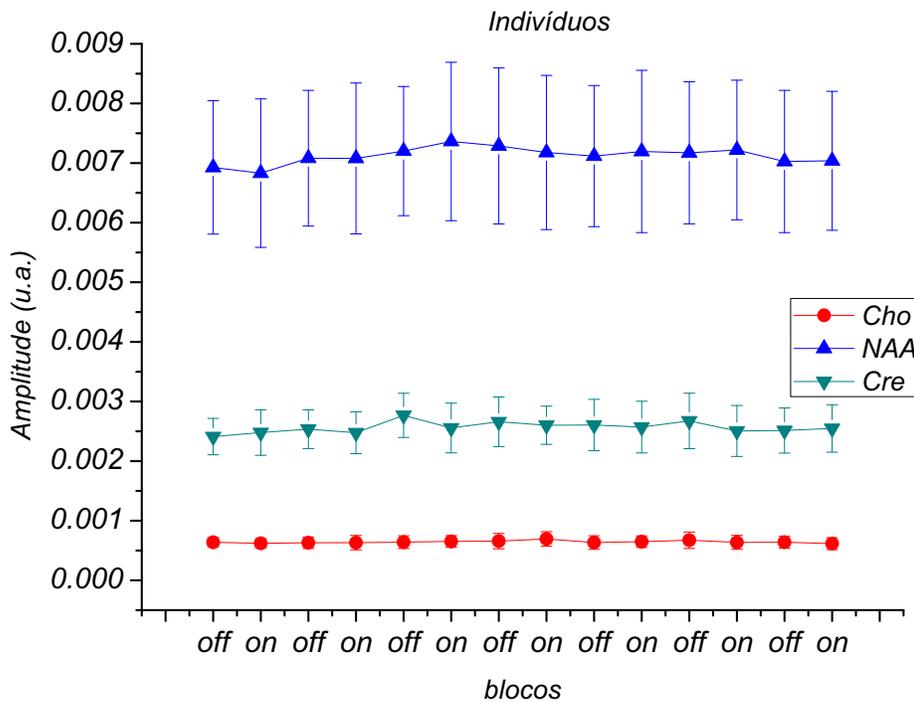


Figura 4.2: Análise ONvsOFF\_Blocos dos metabólitos medidos no Experimento Curto.

Nesta primeira análise (Figura 4.2) tivemos que descartar o Lactato e o Grupo Glx, pois o número de indivíduos cujas quantificações destes metabólitos tiveram CRLB < 30% não foi grande o suficiente para compor uma média confiável. Além disso, não se observa neste gráfico correlação entre os blocos e a concentração para nenhum dos metabólitos medidos. Com isso, fica claro que este tipo de análise não resultou na SNR necessária para estudo dinâmicos.

Outro tipo de análise, denominado *ONvsOFF\_Total* (Figura 4.3), consistiu em fazer a média de todos os blocos *On* e de todos os blocos *Off*, de forma a obter apenas um espectro significativo do estado *On* e outro do estado *Off*, para assim melhorar a SNR. Em seguida, foi feita a quantificação com o LCMoel destes dois espectros de cada indivíduo, e os valores encontrados foram novamente promediados sobre os indivíduos. Estes resultados estão mostrados no gráfico da Figura 4.4. Neste gráfico, as abscissas representam o estado (*Off* ou *On*) e as ordenadas novamente representam valores promediados das concentrações absolutas fornecidas pelo LCMoel, em unidades arbitrárias.

A partir deste gráfico (Figura 4.4), notamos que o conjunto maior de valores utilizados para compor a média resultou numa redução dos valores CRLB para as quantificações do Glx, permitindo calcular a média para este grupo. No entanto, esta abordagem ainda não produziu uma SNR suficiente para a medida do Lactato. Em relação aos demais metabólitos (NAA, Cre

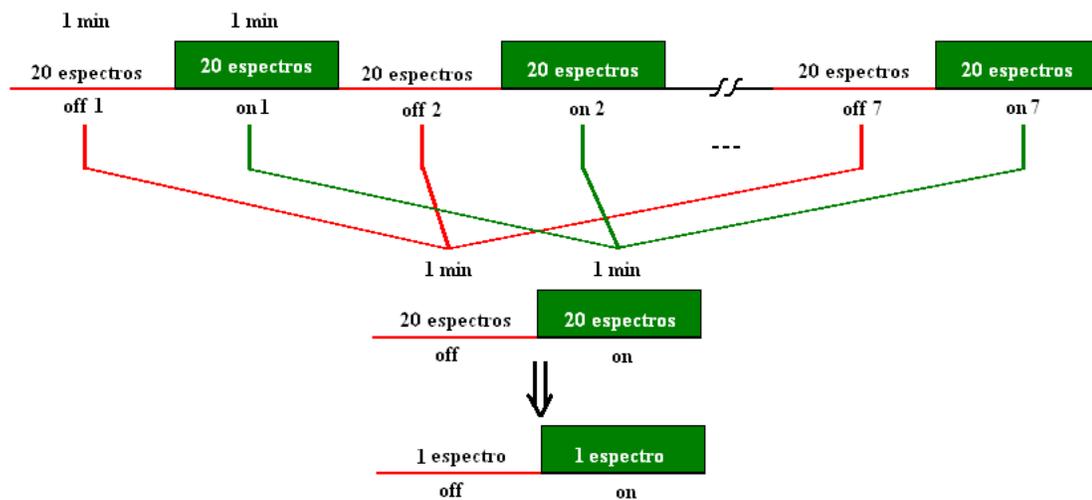


Figura 4.3: Esquema da análise ONvsOFF\_Total do Experimento Curto.

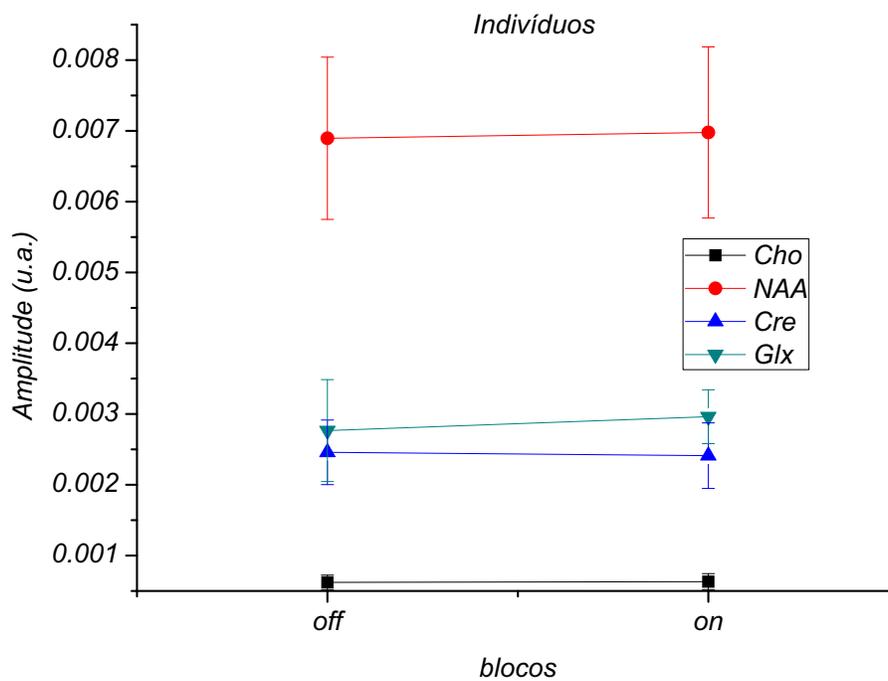


Figura 4.4: Análise ONvsOFF\_Total do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Curto.

e Cho), vemos que as barras de erro resultantes são muito maiores que qualquer variação nos valores médios das concentrações, o que indicaria que não houve variação das mesmas.

De modo geral, os resultados deste experimento não permitiram tirar muitas conclusões quanto à dinâmica metabólica. Isso nos fez retornar à literatura em busca de modificações que poderiam ser feitas no experimento. Uma delas seria a revisão do paradigma, que deveria ser mais longo para evitar efeitos transientes. Outra modificação seria incluir alguma referência inicial ou *Baseline* para acompanhar as variações de forma percentual. Além disso, percebemos que a falta de um phantom prejudicava qualquer conclusão feita com os dados, pois não havia como checar o estado do hardware de aquisição. Estas constatações levaram ao experimento longo.

## 4.2 Experimento Longo

Este novo experimento, além de implementar as observações feitas no final da seção anterior, também serviu para testar muitas das novas rotinas desenvolvidas.

Testamos então a análise denominada *Janela10* (Figura 4.5), que consiste em fazer a média entre o espectro central e seus nove vizinhos mais próximos, criando um efeito de borramento ao longo do tempo que suaviza a divisão entre os estados *On* e *Off*, e reduz o número de espectros de 100 para 91 por indivíduo (Figura 4.5). Estes espectros promediados foram quantificados pelo LCMModel. Em seguida, os valores das quantificações dos 90 espectros de cada indivíduo foram comparados ao primeiro espectro *Off* da sequência, mostrando a variação relativa a este ponto inicial. Finalmente estas variações percentuais foram promediadas sobre os indivíduos, compondo as médias mostradas nos gráficos das Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, para o Grupo Colina, a Creatina total e o NAA total respectivamente. Portanto nestes gráficos, as abscissas representam pontos temporais separados por um espectro, mas que contêm informação de 10 espectros promediados, e as ordenadas representam variações percentuais em relação ao primeiro ponto (média dos 10 primeiros espectros).

Nesta análise, como já era esperado devido aos resultados obtidos para o Experimento Curto (Figura 4.2), o número de valores com  $CRLB < 30\%$  usados para compor a média não foi suficiente para estudar nem o Lactato nem o Grupo Glx, nem para os indivíduos e nem para o phantom.

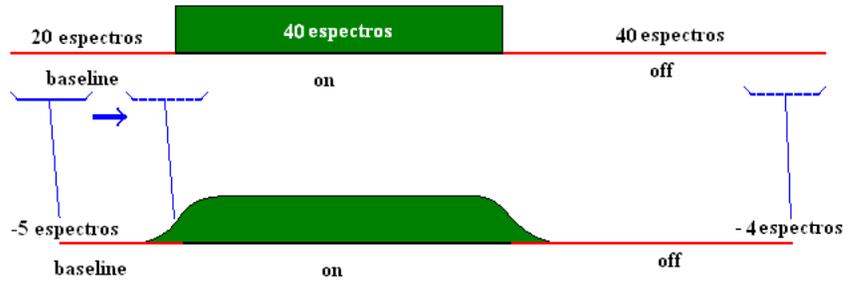


Figura 4.5: Esquema da análise Janela10 do Experimento Longo.

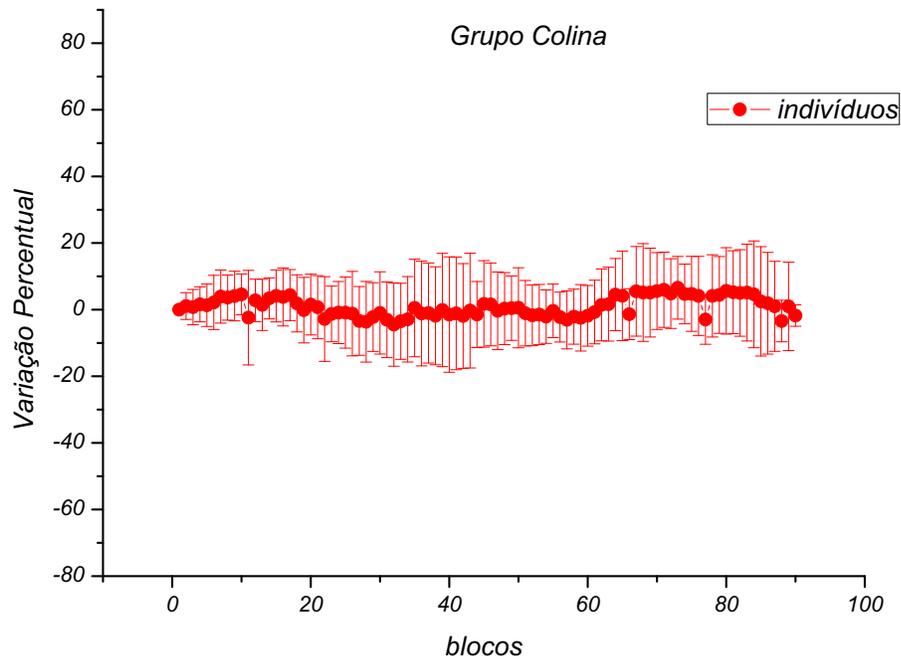


Figura 4.6: Análise Janela10 do grupo Colina medido no Experimento Longo.

Como nosso phantom não possuía metabólitos do grupo Colina (Tabela 3.1), o gráfico da Figura 4.6 apenas apresenta os resultados pertinentes aos indivíduos. Dado que o número de médias usadas para cada espectro a ser quantificado foi baixo (comparado, por exemplo, com a análise ONvsOFF\_Total feita para o Experimento Curto), a SNR obtida também foi baixa.

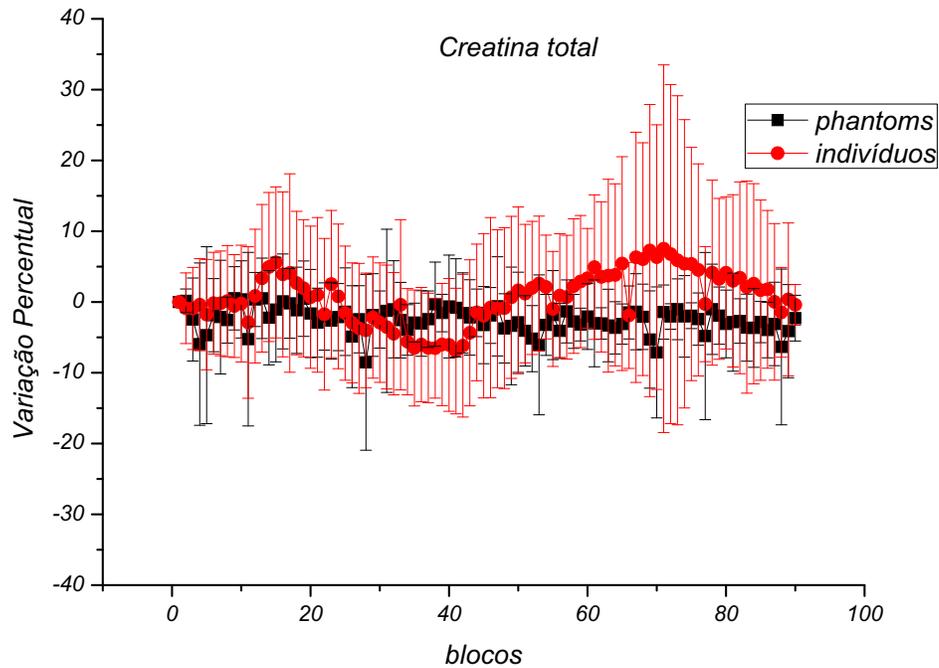


Figura 4.7: Análise Janela10 da Creatina total medida no Experimento Longo.

Para a Creatina e NAA totais (Figuras 4.7 e 4.8) é possível comparar as medidas entre os indivíduos e o phantom. Nota-se claramente que a SNR dos indivíduos é inferior à do phantom. Vemos que para todos os casos (todos os metabólitos e tanto para indivíduos quanto para phantom), as barras de erro são bem superiores às variações percentuais, e portanto podemos descartar a detecção de qualquer mudança nas concentrações metabólicas. Com relação ao phantom, essa constatação apenas mostra que podemos confiar na estabilidade temporal, mas não necessariamente nas medidas da máquina.

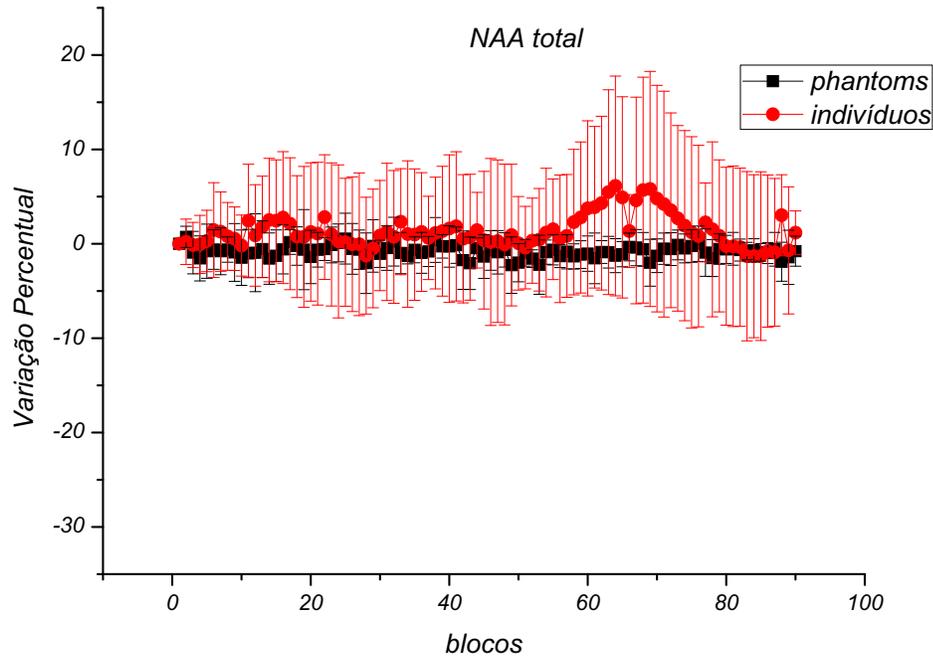


Figura 4.8: Análise Janela10 do NAA total medido no Experimento Longo.

Outra análise feita, denominada *Grupo20* (Figura 4.9), consistiu em dividir a sequência de espectros em grupos independentes de 20 espectros, e calcular as médias de cada grupo. Dessa forma a *Baseline*, que era composta por 20 espectros, foi reduzida a um espectro, e os blocos *On* e *Off*, compostos por 40 espectros cada, foram reduzidos a dois espectros cada. Estes 5 espectros por indivíduo foram quantificados pelo LCMModel, e os valores encontrados para todos os espectros foram relacionados ao primeiro espectro, que neste caso era exatamente a média da *Baseline*. Isso resultou novamente em variações percentuais para cada indivíduo, que foram promediadas e estão mostradas nos gráficos das Figuras 4.11, 4.12, 4.13 e 4.10. Portanto nestes gráficos, as abscissas representam pontos temporais correspondentes a 20 espectros cada, e as ordenadas representam novamente variações percentuais em relação ao primeiro ponto (média da *Baseline*).

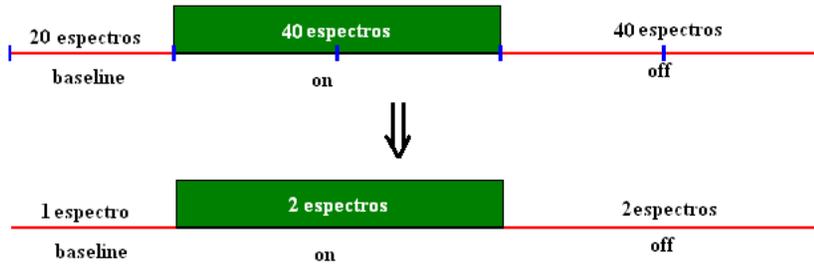


Figura 4.9: Esquema da análise Grupo20 do Experimento Longo.

Assim como na análise ONvsOFF\_Total feita para o Experimento Curto, um conjunto de 20 valores não foi suficiente para gerar resultados (com CRLB < 30%) referentes ao metabólito Lactato, mas foi suficiente para gerar resultados para o Grupo Glx (Figura 4.10). Infelizmente, as barras de erro ainda não permitem tirar qualquer conclusão relativa à variação deste grupo metabólico.

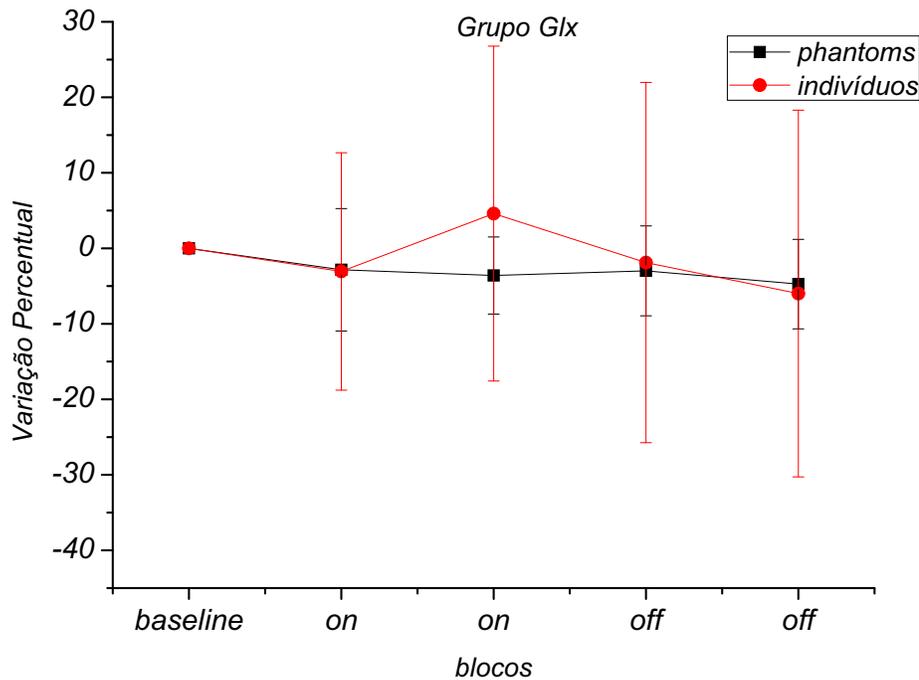


Figura 4.10: Análise Grupo20 do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo.

Novamente, a falta do Grupo Colina no phantom não permite conclusões para este metabólito (Figura 4.11).

No caso do NAA total (Figura 4.13), pode-se destacar que os pontos referentes aos indiví-

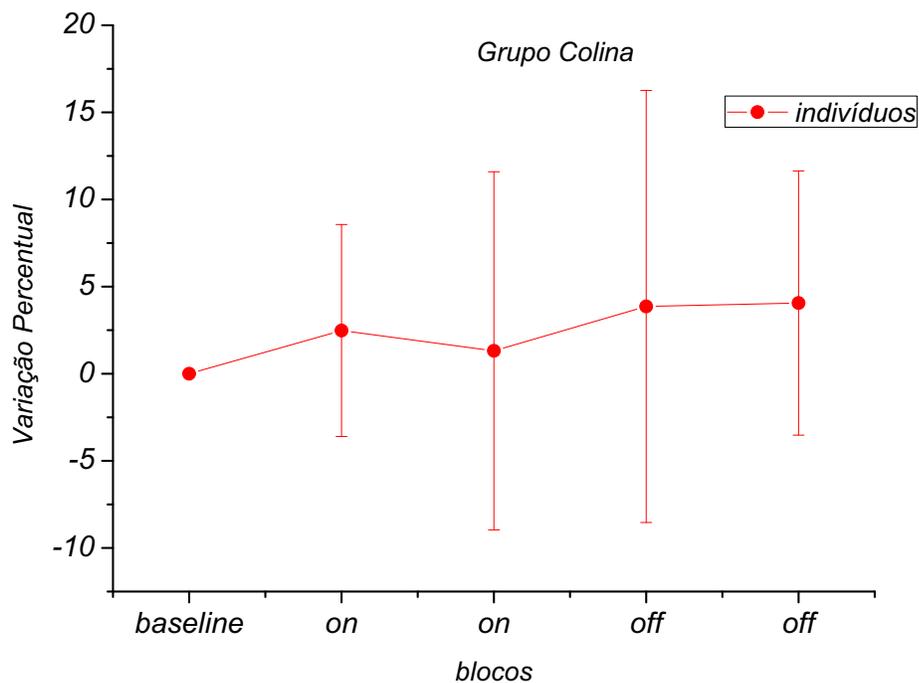


Figura 4.11: Análise Grupo20 do grupo Colina medido no Experimento Longo.

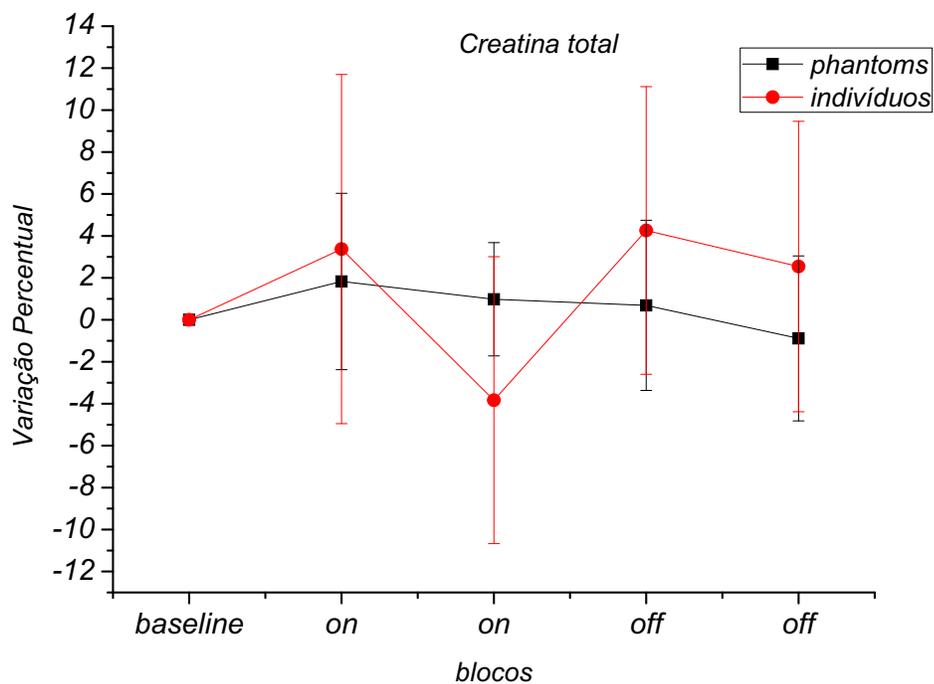


Figura 4.12: Análise Grupo20 da Creatina total medida no Experimento Longo.

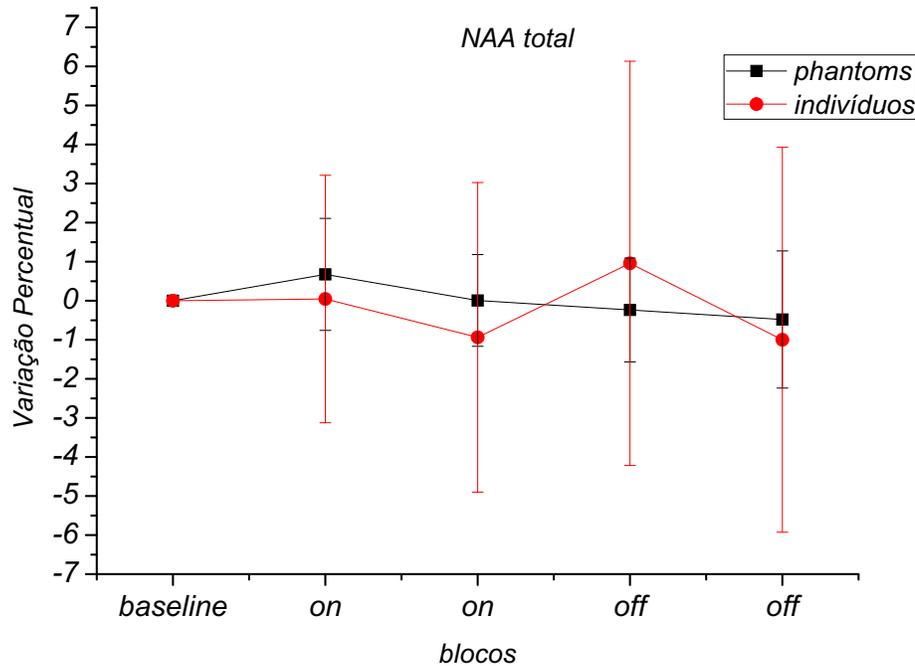


Figura 4.13: Análise Grupo20 do NAA total medido no Experimento Longo.

duos permanecem dentro do erro dos resultados para o NAA total do phantom. Já para a Cretina total (Figura 4.12), a tendência dinâmica observada deve ser considerada com cuidado, pois os pontos referentes ao estado *On* não seguem o mesmo padrão.

Além do já mostrado pelas barras de erro, todos estes resultados não são confiáveis por um segundo motivo: durante este experimento o equipamento de MR apresentou problemas e em várias aquisições metade das bobinas de gradiente estavam desligadas. Consequentemente, nestas aquisições não foi possível fazer a sequência funcional, obrigando-nos a posicionar o voxel apenas por referências anatômicas, guiadas pela avaliação visual da SNR dos espectros (Figuras 3.7(a) e 3.7(b)), que tentamos manter a mesma para todos os indivíduos. Outro problema ocorrido deveu-se ao longo tempo desta aquisição, e ao fato de que o sistema Eloquence não mantém um link de sincronismo com o sistema de aquisição (máquina de MR) para as aquisições de MRS. Isto gerou um pequeno descompasso, que se agravou nas aquisições mais longas resultando em que o Eloquence encerrasse o experimento (tela de repouso) antes do previsto. Além disso, como já mencionado, a solução do phantom desenvolvido acabou se deteriorando fazendo com que as 3 últimas das 11 aquisições tivessem que ser descartadas. Isso nos levou às pequenas modificações que resultaram no Experimento Longo Modificado, onde o posicionamento do voxel original (Figura 3.9) também foi revisado e modificado para um voxel

compreendido em apenas um hemisfério (Figura 3.12), para evitar a contaminação com o líquido presente na interfissura.

### 4.3 Experimento Longo Modificado

Na seção anterior, comentamos que o Experimento Longo apresentou uma série de dificuldades que prejudicaram a qualidade dos dados. Por causa disso, o conserto dos gradientes e a chegada do phantom oficial do projeto CInAPCe impulsionaram a revisão dos parâmetros experimentais e análises.

Para solucionar o problema da falta de sincronismo do Eloquence decidimos eliminar os espectros nos períodos de transição entre os blocos. Para tanto, descartaram-se os dois primeiros espectros e os três últimos de cada um dos blocos. Em seguida utilizou-se a rotina Grupo para dividir a sequência de espectros em médias de grupos de cinco espectros independentes. Isso resulta em três espectros para a *Baseline* e sete espectros para cada bloco *On* e *Off*.

Depois pela análise, denominada *BaselineOnOff* (Figura 4.14), calcula-se a média dos espectros remanescentes dentro do mesmo bloco, gerando um espectro representativo de cada bloco. Estes 3 espectros são quantificados pelo LCMModel, e novamente é feita uma média inter-sujeitos desses resultados. Mesmo com esta abordagem mais drástica de juntar tantos espectros, os resultados obtidos para a média do Lactato ficaram com SNR abaixo do esperado. Logo apenas os resultados para os demais metabólitos são mostrados (gráficos das Figuras 4.15, 4.16, 4.17 e 4.18).

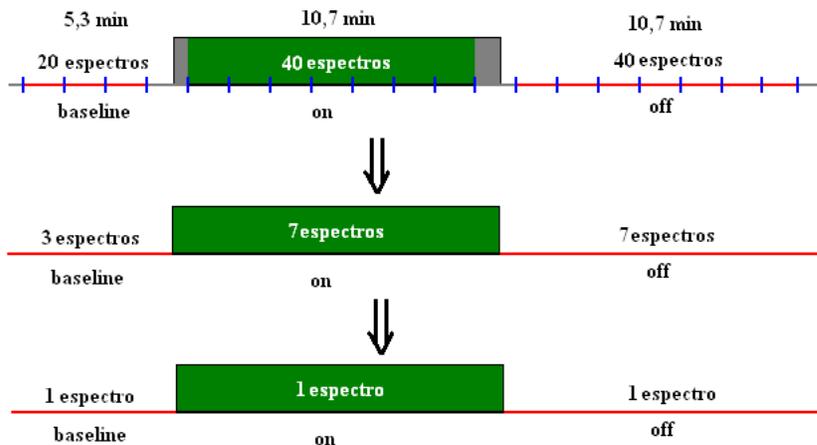


Figura 4.14: Esquema da análise *BaselineOnOff* do Experimento Longo Modificado.

Para o Grupo Glx (Figura 4.15), a aparente invariância do metabólito no bloco *On* deve ser interpretada com cuidado, pois pela hipótese experimental tanto o bloco *Baseline* quanto o

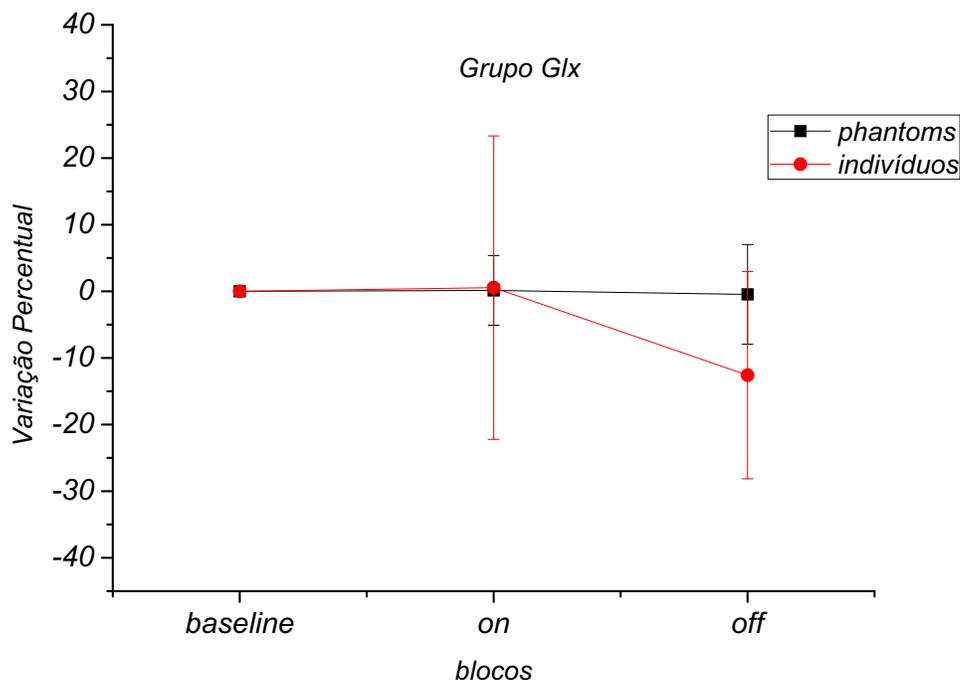


Figura 4.15: Análise BaselineOnOff do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo Modificado.

bloco *Off* possuem a mesma resposta metabólica, e portanto esta diferença poderia ser atribuída à menor estatística do bloco *Baseline*.

Tanto o grupo Colina (Figura 4.16), quanto a Creatina (Figura 4.17) e NAA totais (Figura 4.18), apresentaram as mesmas tendências tanto para os indivíduos quanto para os phantoms. No entanto, como ocorreu nas análises anteriores, a barra de erro para os dados dos indivíduos é bem maior que qualquer variação mostrada, e portanto, a princípio, nada se pode afirmar.

## 4.4 Análises complementares

Como o Experimento Longo Modificado não apresentou os problemas dos experimentos anteriores, esses dados também foram utilizados em uma série de análises complementares.

### 4.4.1 Análise sobre o uso ou não de ECC

A grande maioria dos trabalhos que usam MRS *in vivo* aplicam a correção de fase descrita na Seção 3.3.2 e conhecida como correção de eddy-currents ou ECC. O princípio por trás desta

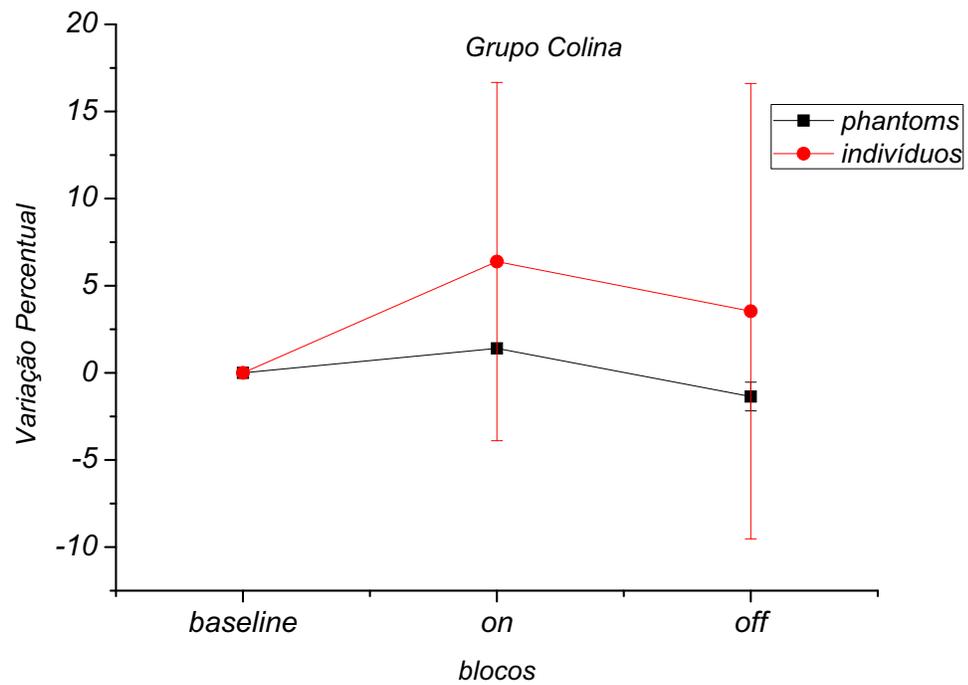


Figura 4.16: Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado.

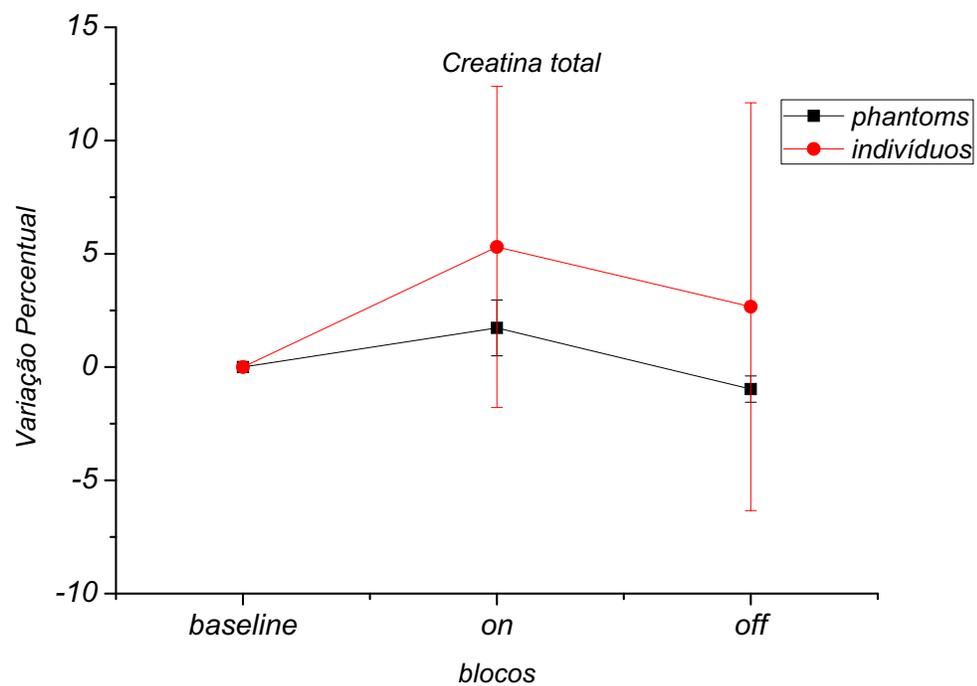


Figura 4.17: Análise BaselineOnOff da Creatina total medido no Experimento Longo Modificado.

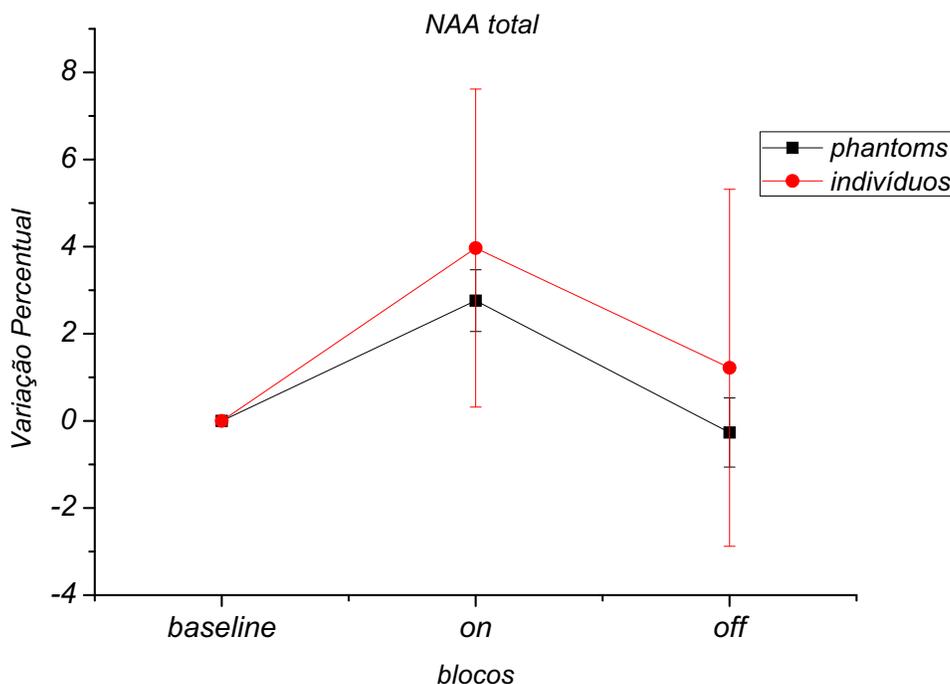


Figura 4.18: Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado.

correção é que se espera que a variação da fase do FID com supressão da água seja a mesma variação da fase do FID sem supressão, e portanto subtraindo a primeira da segunda ponto a ponto, essa variação indesejada seria eliminada. No entanto, como nossa aquisição é muito longa e não se mede nenhum outro espectro de referência ao longo da aquisição, não se pode garantir que o deslocamento de fase seja o mesmo para toda aquisição, e portanto, não estávamos certos de se neste caso deveríamos usar esta correção. Logo, comparou-se como seria a quantificação do LCModel com e sem a ECC. Neste estudo as quantificações foram feitas com os mesmos dados e para os principais metabólitos (NAA total, Creatina total e grupo Colina). Os gráficos das Figuras 4.19, 4.20 e 4.21 mostram estas comparações.

Tanto para o NAA total (Figura 4.20) quanto para a Creatina total (Figura 4.19), as quantificações feitas pelo LCModel com e sem ECC seguiram uma mesma tendência, porém os resultados com a ECC resultaram em valores de CRLB piores.

Já para o grupo Colina (Figura 4.21), o LCModel não foi capaz de quantificá-lo quando foi aplicada a ECC. Este caso ainda precisaria de mais atenção, pois nestes espectros é possível identificar o pico referente ao grupo Colina, e no entanto o LCModel não foi capaz de identificá-lo (Figura 4.22).

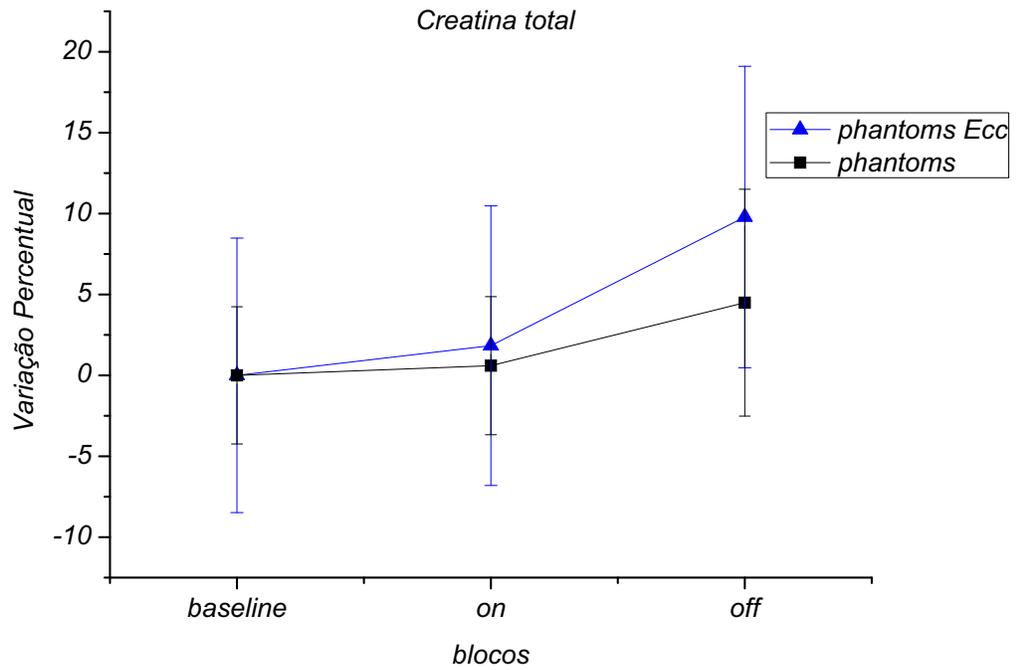


Figura 4.19: Análise BaselineOnOff da Creatina total medida no Experimento Longo Modificado.

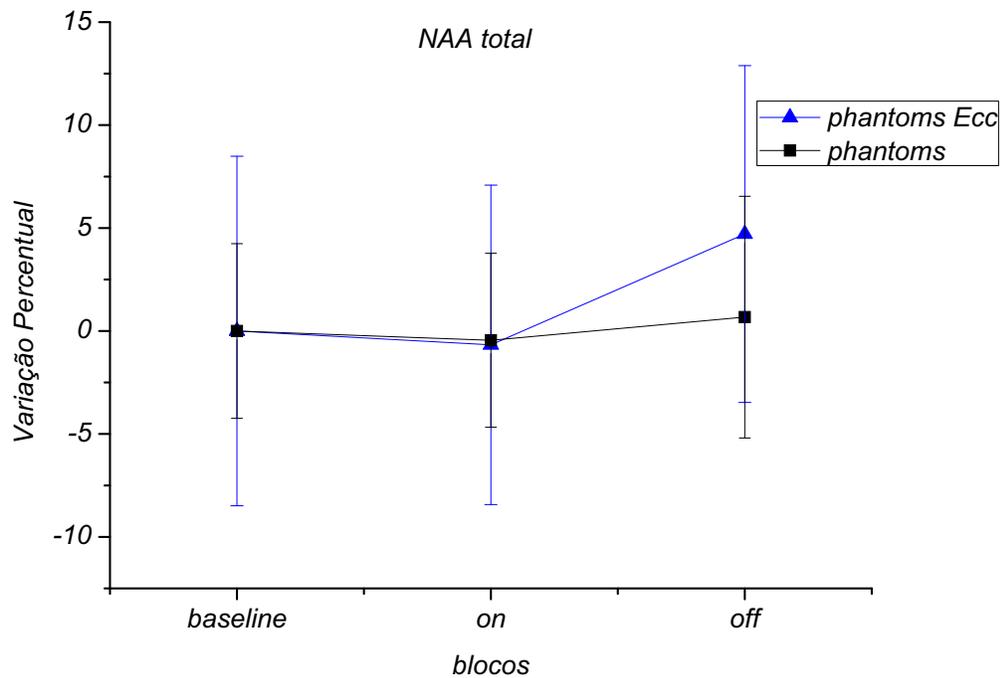


Figura 4.20: Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado.

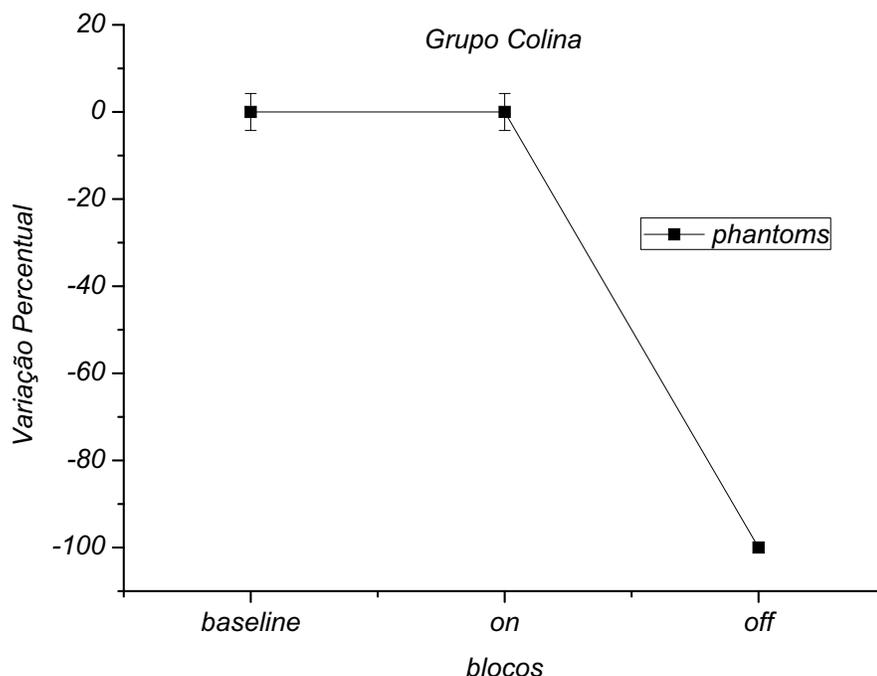


Figura 4.21: Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado.

#### 4.4.2 Análise média pré-quantificação

Uma possível análise que foi estudada e parcialmente implementada foi a análise com o cálculo das médias intersujeitos realizado pré-quantificação. Para este tipo de análise os espectros de todos os sujeitos foram alinhados utilizando as rotinas descritas na Seção 3.3.2. Em seguida, estes espectros foram combinados entre os indivíduos, ou seja, foi feita uma média entre os espectros número um de todos os indivíduos, depois entre os espectros número dois, etc., o que resultou numa série temporal de 100 espectros promediados. Nosso objetivo era ter espectros finais com alta SNR para que fossem quantificados pelo LCModel. Embora este tipo de procedimento tenha sido encontrado na literatura nos trabalhos (MANGIA et al., 2007a) e (MANGIA et al., 2007b), e seja uma prática relativamente comum em estudos de grupos de indivíduos em fMRI (onde se concatenam as séries temporais de diversos indivíduos), ainda assim existem críticas relacionadas à validade deste tipo de procedimento. Em particular, até o término deste trabalho não se encontrou uma maneira de normalizar a amplitude dos espectros antes da promediação entre indivíduos, deixando o método suscetível as variações de carga na bobina receptora e certamente influenciaram o cálculo da média de forma ponderada, tanto para os indivíduos quanto para os phantoms.

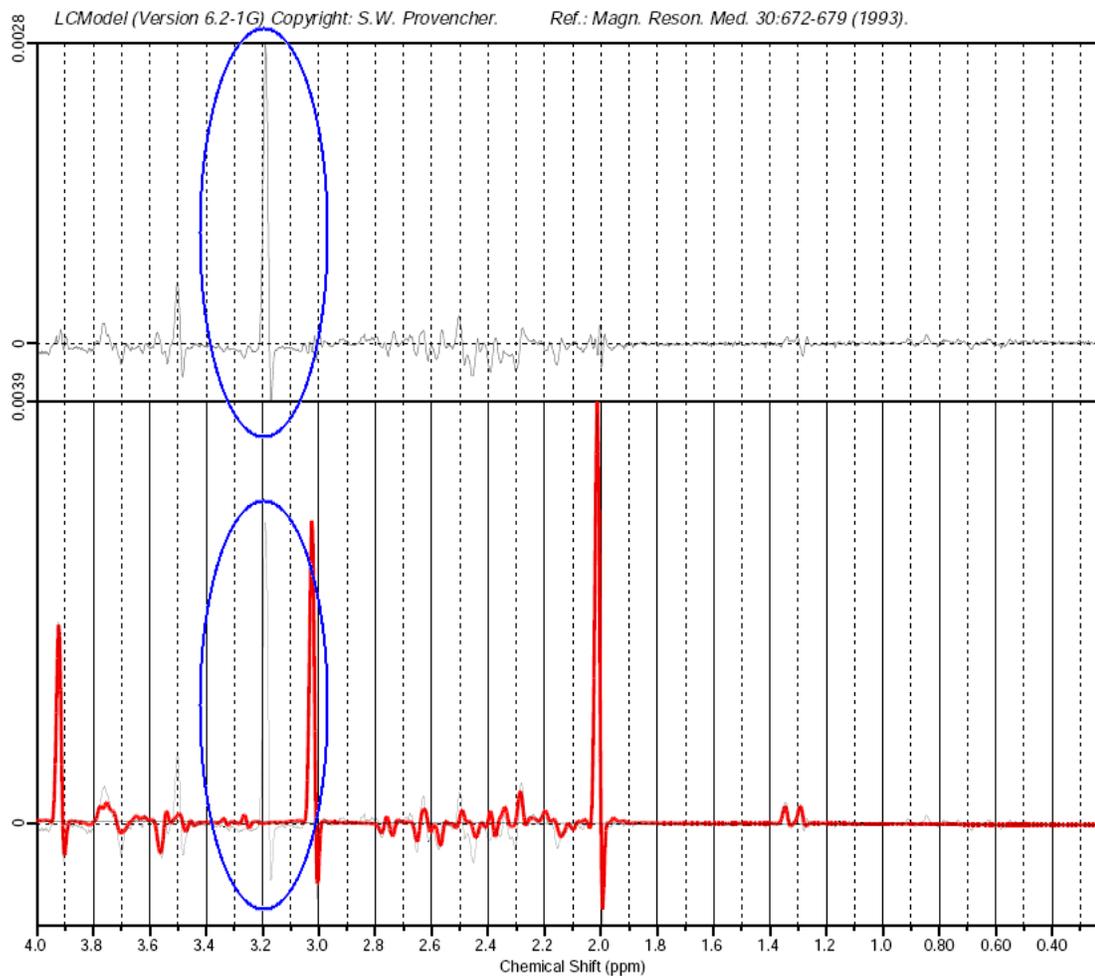


Figura 4.22: Ajuste e resíduo calculados pelo LCMoDel utilizando o ECC: Em vermelho o ajuste encontrado, e na porção superior o resíduo encontrado. Notar que o destaque azul mostra o pico do grupo Colina que não foi ajustado e resultou em um resíduo elevado.

Apesar deste potencial problema, uma análise *BaselineOnOff* (Figura 4.14) foi conduzida com a média intersujeitos feita antes da quantificação, para poder comparar com os resultados anteriores (média pós-quantificação). Deve-se frisar que neste processamento o LCModel atribuiu valores de CRLB piores para a média das aquisições do phantom do que para a média dos indivíduos (o que faz sentido, já que tínhamos um maior número de indivíduos que de aquisições phantom). Os resultados da análise com a média pré-quantificação estão mostrados nas Figuras 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27.

A primeira coisa que é importante destacar nestes gráficos é que, devido à enorme quantidade de promediações levadas a cabo, finalmente obtivemos barras de erro que não ofuscam possíveis variações metabólicas.

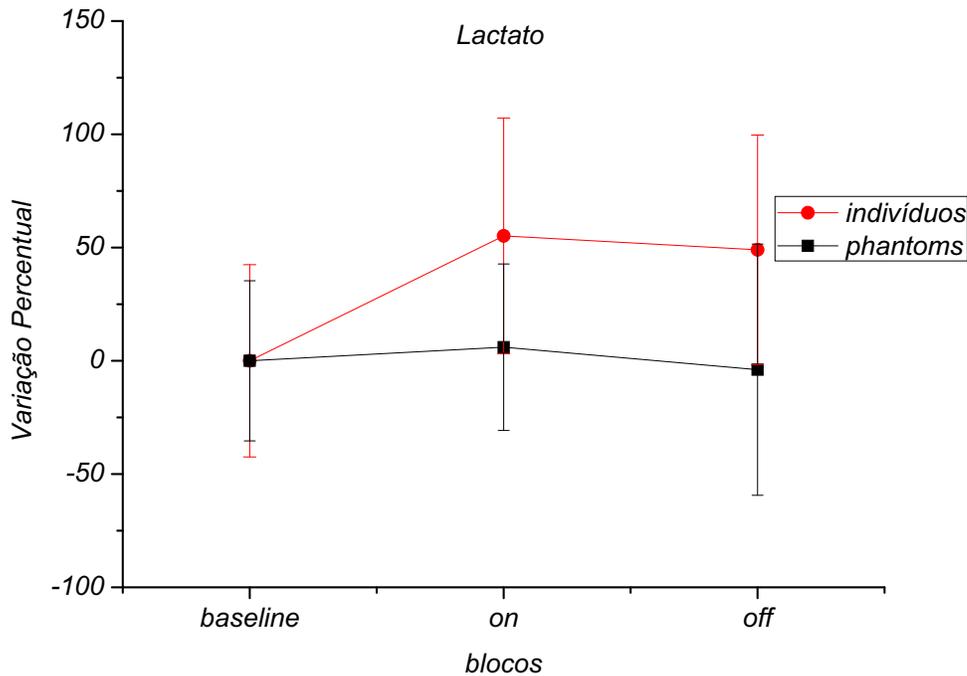


Figura 4.23: Análise *BaselineOnOff* do Lactato medido no Experimento Longo Modificado.

Nesta abordagem, o mesmo processamento *BaselineOnOff* foi capaz de aumentar a SNR a ponto de permitir uma quantificação satisfatória para o metabólito Lactato dos indivíduos (Figura 4.23), mesmo tendo uma baixa concentração. Por outro lado, por causa desta baixa concentração, este metabólito apresentou variações percentuais elevadas, e grandes barras de erro (se comparado aos demais metabólitos). Apesar disso é possível observar a subida dos níveis de Lactato na presença do estímulo, resultado que concorda com a literatura. No entanto, para os nossos indivíduos estes níveis não voltaram para o estado basal após o estímulo, o

que discorda dos resultados reportados na literatura (onde o aumento de Lactato acompanha o estímulo, retornando em seguida à linha de base após o cessar do mesmo).

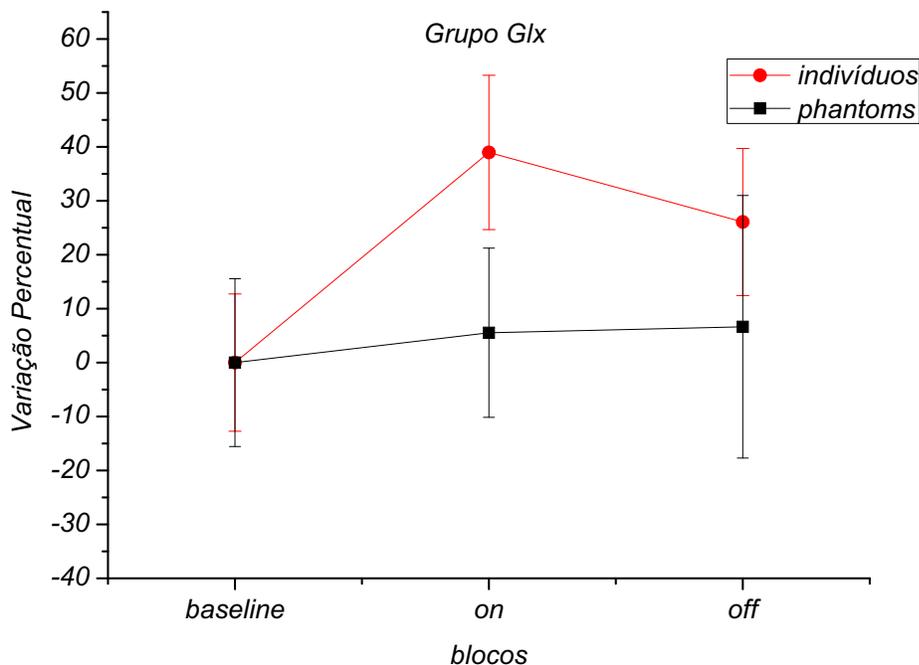


Figura 4.24: Análise BaselineOnOff do grupo Glutamato/Glutamina (Glx) medido no Experimento Longo Modificado.

Para o Grupo Glx, o gráfico da Figura 4.24 mostra um aumento de  $\sim 40\%$  estatisticamente confiável nos níveis deste grupo, que permite distinguir os períodos com e sem estímulo. Este resultado concorda com resultados da literatura (MANGIA et al., 2007a), que reportaram um aumento do metabólito Glutamato com o estímulo, e seu decréscimo até os níveis basais após o cessar do mesmo.

No gráfico da Figura 4.25, notamos que a quantificação do último ponto do Grupo Colina para os phantoms apresentou problemas. Neste caso, novamente o LCMModel não foi capaz de localizar o metabólito, mesmo sendo possível identificá-lo visualmente.

Para o NAA total mostrado na Figura 4.26, observamos uma queda estatisticamente confiável de  $\sim 2\%$  para o bloco *On*. Esta variação poderia estar associada às mesmas variações reportadas em (ZHU; CHEN, 2001) e (MANGIA et al., 2007b) a qual é atribuída a alteração da susceptibilidade magnética da região devida ao efeito BOLD que aumenta o  $T_2$  e diminuiria a altura do pico espectral.

Já a Creatina total, mostrada no gráfico da Figura 4.27, não apresentou variação significativa.

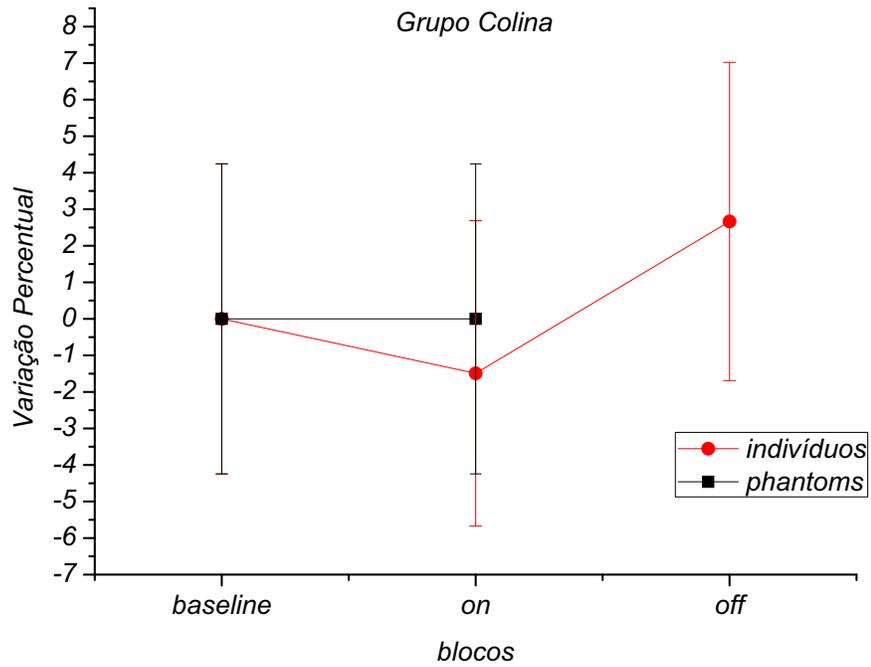


Figura 4.25: Análise BaselineOnOff do grupo Colina medido no Experimento Longo Modificado.

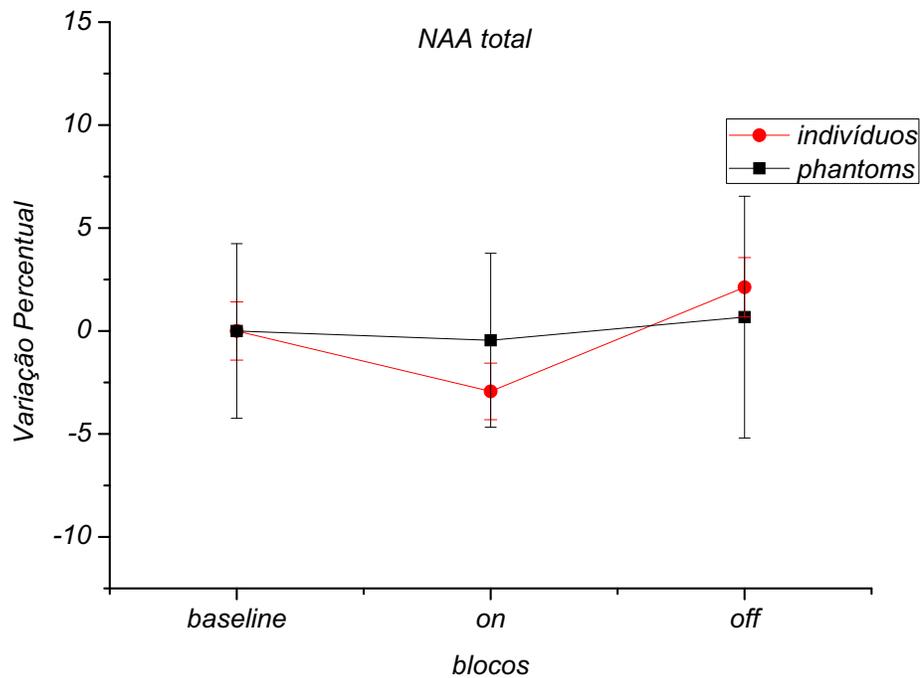


Figura 4.26: Análise BaselineOnOff do NAA total medido no Experimento Longo Modificado.

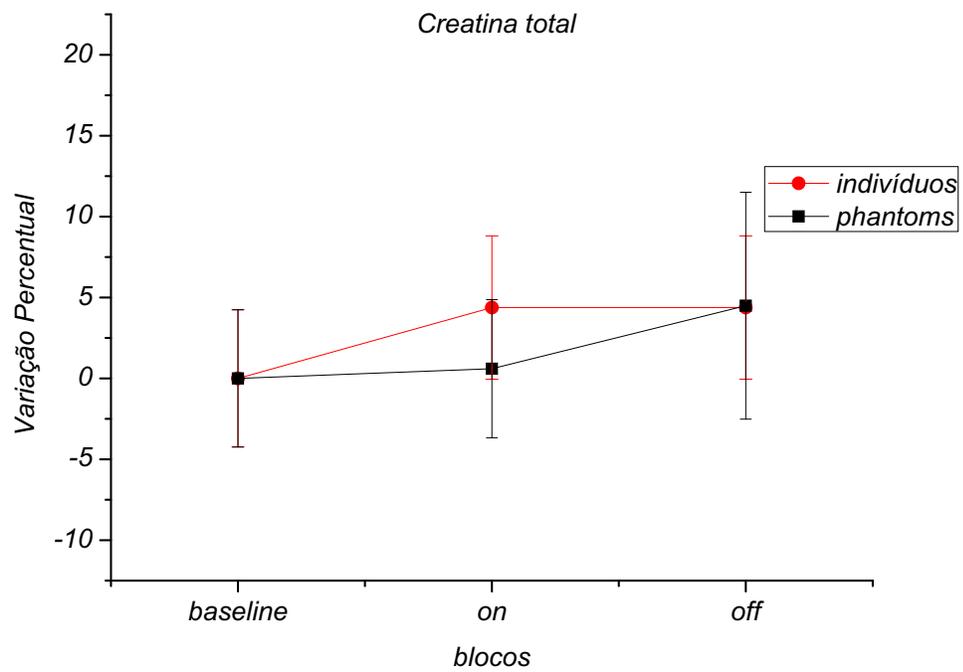


Figura 4.27: Análise BaselineOnOff da Creatina total medida no Experimento Longo Modificado.



## 5 *Conclusões finais*

Apresentamos aqui os resultados dos primeiros experimentos realizados no Brasil com a técnica de MRS funcional, cujo objetivo é a detecção de variações nos níveis de metabólitos específicos, subjacentes à ativação neuronal decorrente de um estímulo.

Nossos experimentos focaram na utilização de um estímulo visual, por ser um que produz uma grande ativação e é independente da vontade do indivíduo, e portanto tem sido altamente explorado na literatura em experimentos funcionais.

Dentre os vários paradigmas testados, dois foram explorados mais a fundo, um consistindo de vários blocos de 1 minuto de duração (Experimento Curto), que não se mostrou adequado para a detecção das variações almejadas, e outro com poucos (3) blocos de longa duração (mais de 5 minutos) (Experimento Longo). Este paradigma foi mais explorado, tendo gerado dois protocolos experimentais (Experimentos Longo e Longo Modificado) com algumas diferenças entre alguns parâmetros, sendo a mais importante o posicionamento do voxel, que num caso foi posicionado centralmente no córtex occipital (Longo), para depois ser posicionado num único hemisfério (direito) nesta região (Longo Modificado).

Os dados medidos com a utilização destes protocolos foram analisados com uma série de métodos de combinação dos espectros adquiridos, para os quais foi desenvolvido um conjunto de rotinas dedicadas. Em particular, duas formas de análise se contrapuseram: a que consistiu em quantificar os espectros de cada indivíduo separadamente, para depois realizar médias entre as quantificações (análise média pós-quantificação), e a que consistiu em promediar os espectros entre os sujeitos, para depois quantificar (análise média pré-quantificação). Embora esta última abordagem seja condenada por alguns grupos, ela tem sido bastante utilizada na literatura em experimentos de fMRI. Em nosso caso, a análise pré-quantificação foi a única que forneceu resultados acessíveis, onde as variações dos metabólitos não foram superadas pelas barras de erro. Todas as análises pós-quantificação forneceram resultados em que nada se pode afirmar, devido aos grandes erros envolvidos.

A análise pré-quantificação foi realizada apenas nos dados do Experimento Longo Modificado. Com base nesta análise, os principais resultados alcançados foram:

1. Os níveis de NAA total apresentaram uma queda de  $\sim 2\%$  com o estímulo, tendo retornado em seguida ao nível basal. Isto poderia ser atribuído à modificação do pico no espectro devido à variação de susceptibilidade local que gera o efeito BOLD (ZHU; CHEN, 2001), (MANGIA et al., 2007a). Por outro lado, isto discorda dos resultados encontrados por (BASLOW; HRABE; GUILFOYLE, 2007), e está mais de acordo com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura.
2. Os níveis de Creatina total não apresentaram variação significativa, em decorrência do estímulo, para o grupo de indivíduos estudados. Neste caso, isto discorda de (ZHU; CHEN, 2001) e (MANGIA et al., 2007a), que também reportaram pequenas variações deste metabólito em decorrência do efeito BOLD. O fato de uma variação ter sido encontrada para o NAA e não para a Creatina poderia decorrer da maior proeminência do primeiro em relação ao segundo, e do fato de que usamos campos mais baixos que os usados nos trabalhos citados ( $3T$  contra  $4T$  e  $7T$  usados nos trabalhos citados).
3. O grupo Colina também não apresentou variação significativa com o estímulo para o grupo de indivíduos estudados.
4. O Lactato apresentou um comportamento que concordou em parte com a literatura. Esperava-se observar um aumento dos níveis de Lactato na presença do estímulo, algo que de fato aconteceu. Porém também era esperado que com o final do estímulo o nível voltasse ao estado basal, algo que não foi observado, mesmo o período de repouso sendo várias vezes maior que o tempo de resposta encontrado na literatura.
5. O grupo Glx apresentou um aumento considerável ( $\sim 40\%$ ) em seus níveis em decorrência do estímulo, retornando em seguida ao nível basal. Este resultado concorda com os resultados de (MANGIA et al., 2007a), que reportaram um aumento do metabólito Glutamato com o estímulo, e seu decréscimo até os níveis basais após o cessar do mesmo, para experimentos feitos em  $7T$  com estímulos longos.

Com este trabalho pudemos, portanto, alcançar alguns resultados parcialmente concordantes com a escassa literatura da área. Por outro lado, não pudemos melhorar a resolução temporal em relação à reportada em outros trabalhos. Identificamos uma série de obstáculos que devem ser contornados, sendo no momento, o principal, determinar a validade da análise pré-quantificação (ou uma forma de validá-la). Finalmente, acreditamos que este trabalho deixa uma grande contribuição através dos diversos protocolos experimentais e métodos de análise testados, e abre o caminho para pesquisas futuras na área.

## *Referências Bibliográficas*

ANCES, B. M. et al. Temporal dynamics of the partial pressure of brain tissue oxygen during functional forepaw stimulation in rats. *Neurosci Lett*, v. 306, n. 1-2, p. 106–10, jun. 2001. ISSN 0304-3940.

AUBERT, A.; COSTALAT, R. Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 25, n. 11, p. 1476–90, nov. 2005. ISSN 0271-678X.

AUBERT, A. et al. A coherent neurobiological framework for functional neuroimaging provided by a model integrating compartmentalized energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 10, p. 4188–93, mar. 2007. ISSN 0027-8424.

BAK, L. K. et al. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 26, n. 10, p. 1285–97, out. 2006. ISSN 0271-678X.

BASLOW, M. H.; HRABE, J.; GUILFOYLE, D. N. Dynamic relationship between neurostimulation and n-acetylaspartate metabolism in the human visual cortex: evidence that naa functions as a molecular water pump during visual stimulation. *J Mol Neurosci*, v. 32, n. 3, p. 235–45, 2007. ISSN 0895-8696.

BLISS, T. M.; SAPOLSKY, R. M. Interactions among glucose, lactate and adenosine regulate energy substrate utilization in hippocampal cultures. *Brain Res*, v. 899, n. 1-2, p. 134–41, abr. 2001. ISSN 0006-8993.

BOUCARD, C. C. et al. Visual stimulation, 1h mr spectroscopy and fmri of the human visual pathways. *Eur Radiol*, v. 15, n. 1, p. 47–52, jan. 2005. ISSN 0938-7994.

BUXTON, R. B.; WONG, E. C.; FRANK, L. R. Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magn Reson Med*, v. 39, n. 6, p. 855–64, jun. 1998. ISSN 0740-3194.

CAVASSILA, S. et al. Cramér-rao bounds: an evaluation tool for quantitation. *NMR Biomed*, v. 14, n. 4, p. 278–83, jun. 2001. ISSN 0952-3480.

CENDES, F. Mrs and fmri in partial epilepsies. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 61 Suppl 1, p. 78–82, set. 2003. ISSN 0004-282X.

CENDES, F. et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and magnetic resonance imaging volumetry in the lateralization of temporal lobe epilepsy: a series of 100 patients. *Ann Neurol*, v. 42, n. 5, p. 737–46, nov. 1997. ISSN 0364-5134.

CERDÁN, S. et al. The redox switch/redox coupling hypothesis. *Neurochemistry International*, v. 48, n. 6-7, p. 523–530, 2006. ISSN 0197-0186. Glutamate in CNS Metabolism and Neurotransmission: Interactions at the Inter and Intracellular Level.

CHEONG, J. L. Y. et al. Proton mr spectroscopy in neonates with perinatal cerebral hypoxic-ischemic injury: metabolite peak-area ratios, relaxation times, and absolute concentrations. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 27, n. 7, p. 1546–54, ago. 2006. ISSN 0195-6108.

CHIAPPA, K. H. et al. Photosensitive epilepsy studied by functional magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy. *Epilepsia*, v. 40 Suppl 4, p. 3–7, 1999. ISSN 0013-9580.

de Graaf, R. A. *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007. ISBN 9780470026700.

de Graaf, R. A. et al. In vivo 1h-[13c]-nmr spectroscopy of cerebral metabolism. *NMR Biomed*, v. 16, n. 6-7, p. 339–57, 2003. ISSN 0952-3480.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F. Nutrition during brain activation: does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochem Int*, v. 45, n. 2-3, p. 321–51, 2004. ISSN 0197-0186.

GALANAUD, D. et al. [brain magnetic resonance spectroscopy]. *J Radiol*, v. 88, n. 3 Pt 2, p. 483–96, mar. 2007. ISSN 0221-0363.

GRUETTER, R. et al. Localized in vivo 13c nmr spectroscopy of the brain. *NMR Biomed*, v. 16, n. 6-7, p. 313–38, 2003. ISSN 0952-3480.

HAACKE, E. M. et al. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principle and Sequence Desing*. 3. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1999. ISBN 9780471351283.

HILL, R. A. et al. Hemodynamic and metabolic aspects of photosensitive epilepsy revealed by functional magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy. *Epilepsia*, v. 40, n. 7, p. 912–20, jul. 1999. ISSN 0013-9580.

HU, Y.; WILSON, G. S. A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem*, v. 69, n. 4, p. 1484–90, out. 1997. ISSN 0022-3042.

KASISCHKE, K. A. et al. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science*, v. 305, n. 5680, p. 99–103, jul. 2004. ISSN 1095-9203.

KATZ-BRULL, R. et al. Limits on activation-induced temperature and metabolic changes in the human primary visual cortex. *Magn Reson Med*, v. 56, n. 2, p. 348–55, ago. 2006. ISSN 0740-3194.

LI, L. M. et al. Spatial extent of neuronal metabolic dysfunction measured by proton mr spectroscopic imaging in patients with localization-related epilepsy. *Epilepsia*, v. 41, n. 6, p. 666–74, jun. 2000. ISSN 0013-9580.

LOAIZA, A.; PORRAS, O. H.; BARROS, L. F. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci*, v. 23, n. 19, p. 7337–42, ago. 2003. ISSN 1529-2401.

LOVATT, D. et al. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci*, v. 27, n. 45, p. 12255–66, nov. 2007. ISSN 1529-2401.

MADDOCK, R. J. et al. Brain lactate responses during visual stimulation in fasting and hyperglycemic subjects: a proton magnetic resonance spectroscopy study at 1.5 tesla. *Psychiatry Res*, v. 148, n. 1, p. 47–54, nov. 2006. ISSN 0165-1781.

MAJÓŠ, C. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy ((1)h mrs) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. *Eur Radiol*, v. 13, n. 3, p. 582–91, mar. 2003. ISSN 0938-7994.

MANGIA, S. et al. The aerobic brain: lactate decrease at the onset of neural activity. *Neuroscience*, v. 118, n. 1, p. 7–10, 2003. ISSN 0306-4522.

MANGIA, S. et al. Issues concerning the construction of a metabolic model for neuronal activation. *J Neurosci Res*, v. 71, n. 4, p. 463–7, fev. 2003. ISSN 0360-4012.

MANGIA, S. et al. Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: current hypotheses, theoretical predictions and in vivo nmr experimental findings. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 29, n. 3, p. 441–63, mar. 2009. ISSN 1559-7016.

MANGIA, S. et al. The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J Neurochem*, v. 109 Suppl 1, p. 55–62, maio 2009. ISSN 1471-4159.

MANGIA, S.; TKAC, I. Dynamic relationship between neurostimulation and n-acetylaspartate metabolism in the human visual cortex: evidence that naa functions as a molecular water pump during visual stimulation. *J Mol Neurosci*, v. 35, n. 2, p. 245–6; author reply 247–8, jun. 2008. ISSN 0895-8696.

MANGIA, S. et al. Sensitivity of single-voxel 1h-mrs in investigating the metabolism of the activated human visual cortex at 7 t. *Magn Reson Imaging*, v. 24, n. 4, p. 343–8, maio 2006. ISSN 0730-725X.

MANGIA, S. et al. Sustained neuronal activation raises oxidative metabolism to a new steady-state level: evidence from 1h nmr spectroscopy in the human visual cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 27, n. 5, p. 1055–63, maio 2007. ISSN 0271-678X.

MANGIA, S. et al. Dynamics of lactate concentration and blood oxygen level-dependent effect in the human visual cortex during repeated identical stimuli. *J Neurosci Res*, v. 85, n. 15, p. 3340–6, nov. 2007. ISSN 0360-4012.

MOSTERT, J. P. et al. 1h magnetic resonance spectroscopy of the internal capsule in human brain: a feasibility study to detect lactate following contralateral motor activity. *Eur Radiol*, v. 15, n. 7, p. 1349–52, jul. 2005. ISSN 0938-7994.

NARESSI, A. et al. Java-based graphical user interface for the mrui quantitation package. *MAGMA*, v. 12, n. 2-3, p. 141–52, maio 2001. ISSN 0968-5243.

NEHLIG, A.; WITTENDORP-RECHENMANN, E.; LAM, C. D. Selective uptake of [14c]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular 14c-trajectory combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 24, n. 9, p. 1004–14, set. 2004. ISSN 0271-678X.

- OGAWA, S. et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *PNAS*, v. 87, n. 24, p. 9868–9872, 1990.
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, out. 1994.
- PHILIPS. *Philips Magnetic Resonance Application Guide Vol. 4, Spectroscopy*. [S.l.], 2008.
- PORRAS, O. H.; LOAIZA, A.; BARROS, L. F. Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci*, v. 24, n. 43, p. 9669–73, out. 2004. ISSN 1529-2401.
- PROVENCHER, S. W. Automatic quantitation of localized in vivo 1h spectra with lmodel. *NMR in Biomedicine*, v. 14, n. 4, p. 260–264, 2001.
- RAMÍREZ, B. G. et al. Kinetic properties of the redox switch/redox coupling mechanism as determined in primary cultures of cortical neurons and astrocytes from rat brain. *J Neurosci Res*, v. 85, n. 15, p. 3244–53, nov. 2007. ISSN 0360-4012.
- RATINEY, H. et al. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR in Biomedicine*, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2005.
- ROTHMAN, D. L. et al. 1h-observe/13c-decouple spectroscopic measurements of lactate and glutamate in the rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, n. 6, p. 1633–7, mar. 1985. ISSN 0027-8424.
- SÁNDOR, P. S. et al. Mr-spectroscopic imaging during visual stimulation in subgroups of migraine with aura. *Cephalalgia*, v. 25, n. 7, p. 507–18, jul. 2005. ISSN 0333-1024.
- SARCHIELLI, P. et al. Functional 1h-mrs findings in migraine patients with and without aura assessed interictally. *Neuroimage*, v. 24, n. 4, p. 1025–31, fev. 2005. ISSN 1053-8119.
- SIMPSON, I. A.; CARRUTHERS, A.; VANNUCCI, S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 27, n. 11, p. 1766–91, nov. 2007. ISSN 0271-678X.
- SMITH, S. et al. Computer-simulations in magnetic-resonance - an object-oriented programing approach. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE SERIES A*, ACADEMIC PRESS INC JNL-COMP SUBSCRIPTIONS, 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495, v. 106, n. 1, p. 75–105, JAN 1994. ISSN 1064-1858.
- URRILA, A. S. et al. Metabolic imaging of human cognition: an fmri/1h-mrs study of brain lactate response to silent word generation. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 23, n. 8, p. 942–8, ago. 2003. ISSN 0271-678X.
- URRILA, A. S. et al. Stimulus-induced brain lactate: effects of aging and prolonged wakefulness. *J Sleep Res*, v. 13, n. 2, p. 111–9, jun. 2004. ISSN 0962-1105.
- URRILA, A. S. et al. Preliminary findings of proton magnetic resonance spectroscopy in occipital cortex during sleep deprivation. *Psychiatry Res*, v. 147, n. 1, p. 41–6, jun. 2006. ISSN 0165-1781.

Van Zijl, P. C. et al. Determination of cerebral glucose transport and metabolic kinetics by dynamic mr spectroscopy. *Am J Physiol*, v. 273, n. 6 Pt 1, p. E1216–27, dez. 1997. ISSN 0002-9513.

VANHAMME; van den Boogaart, A.; HUFFEL, S. V. Improved method for accurate and efficient quantification of mrs data with use of prior knowledge. *J Magn Reson*, v. 129, n. 1, p. 35–43, nov. 1997. ISSN 1557-8968.

ZHU, X.-H.; CHEN, W. Observed bold effects on cerebral metabolite resonances in human visual cortex during visual stimulation: A functional 1h mrs study at 4 t. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 46, n. 5, p. 841–847, 2001.



***APÊNDICE A – Termo de consentimento livre  
esclarecido***

# **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

## **Espectroscopia Funcional por Ressonância Magnética**

Este projeto pretende adquirir dados do cérebro de pessoas saudáveis através da técnica de Espectroscopia Funcional por Ressonância Magnética (fMRS), com os objetivos de: 1) Desenvolver metodologias para a realização de experimentos de fMRS no equipamento de ressonância magnética (RM) do HC – UNICAMP; 2) Desenvolver metodologias para analisar os dados obtidos através desses experimentos. Para isso, pedimos sua cooperação no sentido de se submeter ao exame de fMRS. Durante esse exame, você será orientado(a) a realizar algum tipo de tarefa, que poderá ser desde ficar impassível olhando para imagens em um monitor de computador, ou mexer alguma parte do corpo (geralmente as mãos), ou apertar botões de um teclado.

O exame de fMRS é um exame parecido com o exame de imagem por ressonância magnética (MRI): você entrará na máquina de RM e lá permanecerá, deitado(a) e imóvel, por volta de 30 a 60 minutos. Durante esse tempo a máquina medirá sinais provenientes de diversas moléculas de interesse no seu cérebro. O exame não causa nenhuma dor e também não possui nenhum efeito nocivo para o corpo humano, mas você poderá sentir desconforto devido ao grande barulho que a máquina faz (para isso lhe serão fornecidos tampões de ouvido), e ao fato de que você deverá permanecer com a cabeça o mais imóvel possível dentro da máquina, para que os sinais possam ser medidos de forma correta. Além disso, devido a que o campo magnético usado na máquina de RM é alto (como um forte ímã), caso você possua algum metal dentro do seu corpo (como pinos, marcapassos, próteses metálicas, balas de revólver), você não poderá, de nenhuma maneira, realizar o exame, e **NÃO DEVE DEIXAR DE AVISAR** o pesquisador responsável (que estiver realizando os exames). Por esse motivo também, antes de entrar na sala da RM, você deverá remover do corpo qualquer objeto metálico, como anéis, brincos, pulseiras, óculos, cartões de banco, etc. Garantimos que em qualquer caso, sua identidade será mantida em sigilo. Você não receberá nenhum pagamento por sua participação nesta pesquisa, mas caso venha a ter despesas de transporte ou alimentação para poder realizar estes exames, elas serão ressarcidas. Você poderá desistir de sua participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem que isso acarrete em qualquer prejuízo para você. Você não obterá nenhuma vantagem direta com este projeto, mas por outro lado, estará auxiliando na melhora do conhecimento sobre o cérebro, o que no futuro poderá auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de doenças cerebrais.

Em caso de alguma dúvida, você pode contactar os pesquisadores Gabriela Castellano (tel: 3521 5519, email: [gabriela@ifi.unicamp.br](mailto:gabriela@ifi.unicamp.br)), Carlos Sato Baraldi Dias (tel: 3521-5525, email: [yuki@ifi.unicamp.br](mailto:yuki@ifi.unicamp.br)), Li Min Li (tel: 3521 7292, email: [limin@fcm.unicamp.br](mailto:limin@fcm.unicamp.br)); ou pode se referir ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (tel: 3521-8936, email: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)).

Eu li, entendi, e estou de acordo em realizar o exame citado.

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local \_\_\_\_\_ e  
data: \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ pesquisador  
responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador  
responsável: \_\_\_\_\_



## ***APÊNDICE B – Questionário para controles***

## Questionário para voluntários

1. Tipo de exame / protocolo:

\_\_\_\_\_

2. Data do exame:

3. Nome do voluntário:

Sexo: ( ) masculino ( ) feminino

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Usa aparelho ou contenção? ( ) Não ( ) Sim. Qual?

4. Endereço (Tel / Email):

5. Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

6. Grau de escolaridade:

Profissão:

Ocupação atual: \_\_\_\_\_ Anterior: \_\_\_\_\_

7. ( ) Destro, ( ) canhoto ou ( ) ambidestro?

Poliglota? ( ) Não ( ) Sim. Quais línguas?

Tem algum canhoto na família? ( ) Não ( ) Sim.

Quem? \_\_\_\_\_

8. Possui algum transtorno sensorial ou motor (déficit auditivo, visual etc)? ( ) Não ( ) Sim.

Qual?

Usa óculos? ( ) Não ( ) Sim. Grau?

9. Histórico de doença neurológica e/ou psiquiátrica em familiares de 1º grau? ( ) Não ( )

Sim.

Quem?

Qual (ou quais) doença(s)?

10. Possui história de doença neurológica e/ou psiquiátrica? ( ) Não ( ) Sim.

Qual (ou quais)

doença(s)? \_\_\_\_\_

11. Possui história de traumatismo crânio-encefálico? ( ) Não ( ) Sim.

O que ocorreu?

\_\_\_\_\_  
Chegou a ficar desacordado/perder a consciência? \_\_\_\_\_ por quanto tempo? \_\_\_\_\_

12. Possui alguma outra doença sistêmica ou condição médica instável ou descompensada?

( ) Não ( ) Sim.

Qual? \_\_\_\_\_

13. Faz uso contínuo de alguma medicação? ( ) Não ( ) Sim. Qual?

\_\_\_\_\_  
De quantos miligramas? \_\_\_\_\_ Quantos comprimidos ao dia? \_\_\_\_\_

Tem queixa de algum efeito colateral dessa medicação? ( ) Não ( ) Sim.

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
14. Tomou algum medicamento ansiolítico, hipnótico, ou antihipertensivo menos de 48 horas antes dos testes? ( ) Não ( ) Sim.

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
15. Tomou café ou alguma outra bebida com cafeína nas últimas 4 horas? ( ) Não ( ) Sim.

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
16. Tem problemas de sono? ( ) Não ( ) Sim. Qual?

\_\_\_\_\_  
Dormiu bem na noite passada? ( ) Não ( ) Sim

17. Tem dificuldades de atenção, aprendizado e/ou memória? ( ) Não ( ) Sim.

Que tipo? \_\_\_\_\_