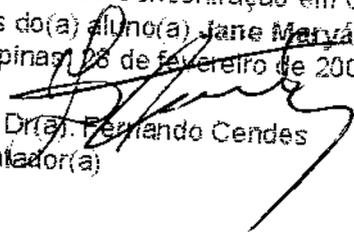


Este exemplar corresponde à versão final da
Tese de Doutorado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médi-
cas, Área de Concentração em Ciências Biomé-
dicas do(a) aluno(a) **Jane Maryam Rondina**,
Campinas, 08 de fevereiro de 2008.


Prof. Dr(a). Fernando Cendes
Orientador(a)

JANE MARYAM RONDINA

**APLICAÇÃO DE IMAGENS FUNCIONAIS POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA ADQUIRIDAS MEDIANTE
ESTÍMULOS DE MEMORIZAÇÃO NO ESTUDO
DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
MEDIAL E CONTROLES - ANÁLISE DE REGIÕES
DE INTERESSE**

CAMPINAS

Unicamp

2008

JANE MARYAM RONDINA

**APLICAÇÃO DE IMAGENS FUNCIONAIS POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA ADQUIRIDAS MEDIANTE
ESTÍMULOS DE MEMORIZAÇÃO NO ESTUDO
DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
MEDIAL E CONTROLES - ANÁLISE DE REGIÕES
DE INTERESSE**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Neurologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES

Campinas

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R668a Rondina, Jane Maryam
Aplicação de imagens funcionais por ressonância magnética adquiridas mediante estímulos de memorização no estudo de pacientes com epilepsia do lobo temporal medial e controles – análise de regiões de interesse / Jane Maryam Rondina. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Fernando Cendes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neuroimagem. 2. Ressonância Magnética. 3. Memória. 4. Epilepsia. 5. Mapeamento cerebral. 6. Cognição. I. Cendes, Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Application of functional magnetic resonance images acquired by means of memorization stimuli in the study of patients with both medial temporal lobe epilepsy and controls – regions of interest analysis

Keywords: • Neuroimage
• Magnetic Resonance
• Memory
• Epilepsy
• Human Brain Mapping
• Cognition

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Neurologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Cendes

Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Prof. Dr. Bráulio Barros de Araújo

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

Profa. Dra. Gabriela Castellano

Data da defesa: 28 - 02 - 2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Prof(a). Dr(a). Fernando Cendes

Membros:

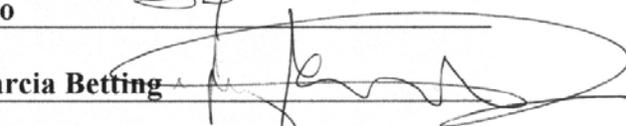
1. Prof(a). Dr(a). Antonio Carlos dos Santos



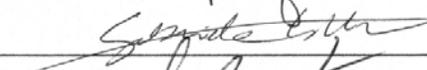
2. Prof(a). Dr(a). Draulio Barros de Araújo



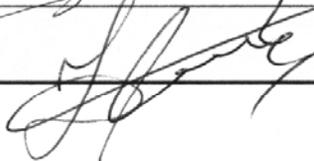
3. Prof(a). Dr(a). Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting



4. Prof(a). Dr(a). Gabriela Castellano



5. Prof(a). Dr(a). Fernando Cendes



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/02/2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria Julia Rondina e Walter Antonio Rondina Neto, pelo incentivo ao desenvolvimento pessoal, desde muito cedo, apesar das dificuldades enfrentadas pela família.

Agradeço ao professor Fernando Cendes, meu orientador, pela disponibilidade e paciência. Como coordenador do Laboratório de Neuroimagem, ele foi o idealizador do desenvolvimento deste projeto multidisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes perfis. Ao professor Roberto Covolan por sua grande colaboração na orientação deste trabalho, constante disponibilidade para discussões e por seu importante envolvimento no projeto. E um agradecimento especial ao professor Benito Damasceno, pioneiro e mentor.

Este trabalho não seria possível sem a colaboração dos colegas: Andréa Aléssio, Maurício Sercheli, Fabrício Ramos, Helka Ozelo, Tatiane Pedro e Elizabeth Bilevicius. Agradecimentos imensos pela divisão do peso do carregamento de um piano de cauda em dias de aquisição de imagens e madrugadas de reconstruções. Especialmente à Andréa, ao Maurício e ao Fabrício pela companhia em dias, noites, feriados e fins de semana de testes comparativos, discussões de resultados (e outras discussões também), compartilhamento das frustrações e também da teimosia em sempre tentar de novo.

Ao Alexandre, pelo companheirismo, apoio e carinho.

Agradecimento à Capes pelo apoio financeiro.

	PÁG.
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
1- INTRODUÇÃO	14
1.1- Técnicas de mapeamento da função cerebral	16
1.2- Objetivos	19
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1- Estudos funcionais em cognição	22
2.1.1- Dificuldades técnicas.....	23
2.1.2- Dificuldades intrínsecas.....	25
2.2- Aplicações de neuroimagem funcional	26
2.2.1- Estudos relacionados à memória.....	26
2.2.2- Estudos relacionados à epilepsia.....	29
2.3- Relacionamento estrutura-função	29
2.3.1- Análise de ROIs <i>versus</i> análise <i>voxel a voxel</i>	30
3- MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1- Indivíduos participantes	35
3.2- Aquisição das imagens	35
3.2.1- Configurações de aquisição.....	36
3.2.2- Projeto do experimento.....	37
3.3- Reconstrução das Imagens	42
3.4- Pré-processamento	44

3.5- Análise.....	48
3.5.1- Definição do modelo.....	51
3.5.2- Análise voxel a voxel e análise de regiões de interesse.....	54
3.5.3- Análise de Grupo.....	60
4- RESULTADOS.....	63
4.1- Comparação das técnicas de análise de grupo (média X concatenada) em controles.....	64
4.1.1- Análise voxel a voxel.....	64
4.1.2- Análise de regiões de interesse.....	70
4.2- Comparações entre grupos.....	71
5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	74
5.1- Pré-processamento individual e pré-processamento em grupo.....	75
5.2- Utilização de suavização na análise de ROIs.....	75
5.3- Análise de grupo concatenada e análise pela média do grupo.....	76
5.4- Análise de ROIs através de <i>templates</i>.....	76
5.5- Comparação entre contrastes.....	77
5.6- Diferenças encontradas entre os grupos.....	77
6- SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	78
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHD	Atrofia Hipocampal Direita
AHE	Atrofia Hipocampal Esquerda
BOLD	<i>Blood Oxygen Level Dependent</i>
DICOM	<i>Digital Imaging Communications in Medicine</i>
EEG	<i>Electroencephalography</i>
EI	Evocação Imediata
ET	Evocação Tardia
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Medial
EPI	<i>Echo Planar Imaging</i>
fMRI	<i>functional Magnetic Resonance Imaging</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FSE	<i>Fast Spin Echo</i>
GRE	<i>Gradient-Echo</i>
IR	<i>Inversion Recovery</i>
LTM	Lobo Temporal Medial
MEG	<i>Magnetoencephalography</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NP	Não-palavra
NIRSI	<i>Near InfraRed Spectroscopic Imaging</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
Rpos	Repouso pós-estímulo
Rpre	Repouso pré-estímulo
REC	Reconhecimento
ROI	<i>Region of Interest</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
TE	Tempo de Eco
TR	Tempo de Repetição

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 3.1- Projecção visual de estímulos.....	37
Figura 3.2- Desenho da sequência de codificação e evocação imediata.....	39
Figura 3.3- Palavras utilizadas como estímulo para a memória verbal.....	39
Figura 3.4- Desenho da sequência de evocação tardia e reconhecimento....	40
Figura 3.5- Desenho completo do experimento.....	41
Figura 3.6- Organização espaço-temporal na reconstrução e conversão de uma seqüência de codificação / evocação imediata.....	43
Figura 3.7- Pré-processamento.....	44
Figura 3.8- Representação da resposta hemodinâmica BOLD.....	49
Figura 3.9- Utilização de mapas de cores para visualização de probabilidade de ativação.....	51
Figura 3.10- Desenho do modelo definido com 5 condições - Repouso pré-estímulo, Nãoopalavra, Palavras, Repouso pós-estímulo e evocação imediata.....	52
Figura 3.11- Desenho do modelo definido com as condições - Não-palavra e Palavras.....	53
Figura 3.12- Desenho do modelo definido com as condições - Repouso pré-estímulo, Nãoopalavra, Palavras e Repouso pós-estímulo....	53
Figura 3.13- Desenho do modelo definido com as condições - Repouso pós-estímulo e Evocação.....	54
Figura 3.14- Formas de definição de ROIs.....	56
Figura 3.15- ROIs originais.....	58

Figura 3.16-	ROIs subdivididas.....	59
Figura 3.17-	Representação da concatenação de séries temporais de 3 indivíduos.....	60
Figura 3.18-	Algoritmo para cálculo da média das imagens 4D de um grupo populacional.....	61
Figura 4.1-	Comparação de abordagens de análise de grupo - Repouso pré-estímulo.....	65
Figura 4.2-	Comparação de abordagens de análise de grupo - Não-palavra.....	66
Figura 4.3-	Comparação de abordagens de análise de grupo - Palavras.....	67
Figura 4.4-	Comparação de abordagens de análise de grupo - Repouso pós-estímulo.....	68
Figura 4.5-	Comparação de abordagens de análise de grupo - Evocação imediata.....	69
Figura 4.6-	Análise de ROIs concatenada.....	70
Figura 4.7-	Análise de ROIs pela média.....	71
Figura 4.8-	Análise de ROIs do grupo de pacientes com atrofia hipocampal esquerda (AHE) - série de codificação verbal - condições: repouso pré-estímulo, não-palavra, palavras, repouso pós-estímulo, evocação imediata.....	72
Figura 4.9-	Análise de ROIs do grupo de pacientes com atrofia hipocampal direita (AHD) - série de codificação verbal - condições: repouso pré-estímulo, não-palavra, palavras, repouso pós-estímulo, evocação imediata.....	73

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a aquisição, processamento e análise de imagens funcionais por ressonância magnética através da aplicação de estímulos para o estudo de processos relacionados à memória verbal e visual em controles e em pacientes com epilepsia do lobo temporal medial associada a atrofia hipocampal. As imagens foram adquiridas pela sequência EPI (*Echo-planar Imaging*) e o sinal BOLD (*Blood-oxygenation-level-dependent*) obtido foi analisado de forma multivariada. O contraste entre as condições definidas no desenho do experimento foi analisado estatisticamente através da utilização do teste *t-student*. Foram realizadas comparações entre diferentes abordagens de processamento das imagens. Foi realizada uma análise de regiões de interesse (ROIs) com o objetivo de explorar as condições definidas no projeto do experimento e avaliar o envolvimento de estruturas anatômicas temporais e frontais no processo de codificação de memória. Foram discutidas questões sobre a utilização de diferentes abordagens de análise individual e de grupo, sobre o planejamento do paradigma e desenho do experimento, sobre o padrão de ativação das estruturas anatômicas consideradas sob diferentes condições e sobre diferenças observadas entre os grupos de pacientes e o grupo de controles.

ABSTRACT

The purpose of this work was the acquisition, processing and analysis of functional magnetic resonance images through the application of stimuli for the study of processes related to both verbal and visual memory in both controls and patients with medial temporal lobe epilepsy associated to hippocampal atrophy. The images were acquired using the EPI (Echo-planar Imaging) protocol and the BOLD (*Blood-oxygenation-level-dependent*) signal was analyzed using a multivariate approach. The contrast between the conditions defined in the design was statistically analyzed using t-test. Voxelwise analysis was performed for comparison among different approaches and ROI (Region of interest) analysis was performed aiming both to explore the conditions defined in the design and to study the involvement of anatomical structures considered (both temporal and frontal) in the memorizing process. Conclusions were obtained about: the use of different analysis approaches; the planning of paradigm and design definition; the activation patterns observed in the anatomical structures considered during the different conditions; and differences observed among the patients and control groups.

1- INTRODUÇÃO

Grande parte do conhecimento sobre o cérebro humano é proveniente do estudo de sua estrutura, notavelmente pelo relacionamento de disfunções neurológicas a padrões de lesões cerebrais. Contudo, através de estudos estruturais não é possível se investigar alterações fisiológicas de curta duração associadas ao funcionamento cerebral. Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse na incorporação de investigações funcionais em neurociência.

Particularmente, em estudos relacionados à epilepsia, existe interesse em se pesquisar se ocorrem diferenças em padrões de ativação funcional que possam ser relacionados a lesões ou outros focos desencadeadores de crises. Progressos significativos em neurociência têm estado relacionados a estudos de epilepsia realizados ao longo de décadas. Avanços como descobertas de causas físicas para problemas neurológicos, estudos relacionados à atividade elétrica no cérebro e o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento têm sido impulsionados por estudos relacionados à epilepsia.

De acordo com o modelo de memória material-específico (Meyer e Yates, 1955; Milner, 1958; Malec, 1991), lesões hipocampais no lobo temporal esquerdo são comumente associadas a *déficits* de memória verbal. Assim, lesões e atrofia em estruturas temporais são frequentemente associadas a alterações de memória, sendo esta relação verificável através de estudos de neuroimagem estrutural associados a testes neuropsicológicos. O interesse em se estudar mecanismos relacionados a processos de memorização tem motivado um crescente interesse pela aplicação de imagens funcionais em estudos de memória.

Uma das formas de investigação do funcionamento cerebral é através de técnicas de neuroimagem funcional. Utilizando-se diferentes formas de tecnologia de aquisição de imagens para medição de aspectos da função cerebral é possível a visualização de fenômenos que auxiliam no entendimento de características do relacionamento entre a atividade em determinadas áreas cerebrais e funções mentais específicas.

Devido ao fato de que estas técnicas revelam padrões de atividade no cérebro *in vivo*, elas têm sido fundamentais no entendimento da função cerebral normal e associação de estados cerebrais anormais a uma variedade de patologias (Purves et al., 2001) [2].

1.1- Técnicas de mapeamento da função cerebral

Os principais métodos de neuroimagem funcional utilizados na atualidade são: fMRI (*functional Magnetic Resonance Imaging*), PET (*Positron Emission Tomography*), SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) e NIRSI (*Near InfraRed Spectroscopic Imaging*). Métodos de obtenção de sinal funcional (como EEG - *multichannel Electroencephalography* e MEG - *Magnetoencephalography*) também têm sido muito importantes na investigação do funcionamento cerebral.

As técnicas EEG e MEG registram flutuações (elétricas e magnéticas, respectivamente) que ocorrem quando uma população de neurônios está ativa. Estes métodos são bastante adequados para a medição do curso de tempo de eventos neurais, pois têm alta resolução temporal (da ordem de milissegundos). No entanto, apresentam baixa resolução espacial, havendo informação restrita sobre a localização precisa de onde estes eventos ocorrem.

As técnicas fMRI, PET, SPECT e NIRSI medem alterações locais no fluxo sanguíneo relacionadas a eventos neurais (que são referidas como ativações). Estas técnicas têm resolução temporal menor que os métodos de aquisição de sinal EEG e MEG (em geral da ordem de segundos), mas, em contrapartida, possibilitam a localização espacial com maior resolução.

Nas técnicas PET, isótopos instáveis de emissão de pósitron são sintetizados em um ciclotron por bombardeamento de nitrogênio, carbono, oxigênio ou flúor com prótons. Quando compostos radiorrotulados são injetados na corrente sanguínea, estes se distribuem de acordo com o estado fisiológico do cérebro. Portanto, oxigênio e glicose rotulados acumulam-se em áreas metabolicamente mais ativas. Conforme o isótopo instável decai, o próton extra quebra-se em um nêutron e um pósitron. Os pósitrons emitidos trafegam por vários milímetros, em média, até colidirem-se com um elétron. Esta colisão destrói as partículas, emitindo 2 raios gama em direções opostas. Detectores de raios gama localizados ao redor da cabeça são, portanto, arrançados para registrar reações simultâneas. A resolução da técnica PET é de aproximadamente 4 milímetros.

Nas técnicas SPECT, um componente radioisotópico com um tempo de meia-vida relativamente baixo é inalado ou injetado na circulação. O componente liga-se a células vermelhas e é conduzido através do corpo. Conforme ocorre a deterioração radioativa, fótons de alta energia são emitidos. Uma gama-câmera movendo-se rapidamente ao redor da cabeça coleta os fótons de diferentes ângulos, permitindo a formação de imagens tridimensionais. A resolução da técnica SPECT é de aproximadamente 8 milímetros.

As técnicas fMRI são baseadas em medições locais do fluxo de oxigênio no sangue. A oxihemoglobina (a forma portadora de oxigênio da hemoglobina) tem um sinal de ressonância magnética diferente da desoxihemoglobina (a forma da hemoglobina desoxigenada) ou do tecido cerebral ao redor. A oxihemoglobina é diamagnética (não tem elétrons não-pareados e tem momento magnético zero). Em contraste, a desoxihemoglobina é paramagnética (tem elétrons não pareados e momento magnético significativo). Acredita-se que áreas cerebrais ativadas por uma tarefa específica utilizem mais oxigênio, o que faz com que, inicialmente, os níveis de oxihemoglobina diminuam e os níveis de desoxihemoglobina aumentem. Em segundos, a microvasculatura cerebral responde a este esgotamento local de oxigênio por um aumento do fluxo de sangue rico em oxigênio para a área ativa. Estas alterações na concentração de desoxihemoglobina levam a alterações localizadas no sinal de ressonância magnética dependentes do nível de oxigênio no sangue (sinal BOLD - *Blood Oxygen Level Dependent*).

Portanto, a técnica fMRI utiliza sinais intrínsecos do cérebro em vez de sinais originados de fontes radioativas exógenas, como nas técnicas PET e SPECT. Conseqüentemente, aquisições repetidas podem ser realizadas em um mesmo indivíduo, o que confere uma vantagem em relação aos outros métodos citados. A realização de exames fMRI em indivíduos saudáveis para compor grupos de controle utilizados em estudos comparativos também é bastante comum. Poucos são os indícios de que a exposição de seres humanos a campos magnéticos, mesmo intensos, tragam prejuízos ao organismo (Araújo, 2002) [3]. A técnica fMRI também oferece localização espacial superior e uma boa resolução temporal (da ordem de segundos) se comparada à ordem de minutos para outras técnicas de imagem funcional.

Apesar das características favoráveis que têm tornado o método fMRI um dos principais recursos da atualidade em pesquisas sobre o funcionamento cerebral, sendo considerado potencialmente como um método diagnóstico promissor, o tema é ainda alvo de muitos estudos. O entendimento dos princípios físicos relacionados aos processos neurais que fundamentam a técnica fMRI ainda não é completo. Os processos de análise são complexos e pequenas diferenças de abordagem podem levar a diferentes resultados. Alterações do sinal em determinadas tarefas podem ser muito sutis e suscetíveis à ação de efeitos confundidores. Há muito a ser investigado sobre paradigmas de aquisição, métodos de análise e de interpretação de resultados. Segundo Gökçay et al. (1999) [4], embora estudos PET, SPECT e fMRI tenham levado a avanços significativos no mapeamento funcional do cérebro humano, estudos adicionais são necessários na direção da localização e quantificação precisa da atividade em cérebros humanos individuais.

A idéia de utilizar propriedades do sangue como indicadores da função cerebral é antiga. Linus Pauling e Charles Coryell em 1936 descobriram que as moléculas de hemoglobina têm propriedades magnéticas que as diferenciam dependendo de estarem ou não ligadas ao oxigênio. Estudos realizados na década de 80 revelaram que as diferenças resultantes na susceptibilidade magnética poderiam ser medidas usando imagens de ressonância magnética (Thulborn et al., 1982 [5]).

Na década de 90, importantes estudos demonstraram a viabilidade de utilização do contraste BOLD. Em 1990, Ogawa e Lee [6] demonstraram que alterações na oxigenação sanguínea poderiam ser visualizadas usando imagens ponderadas por T2*.

As primeiras aplicações do sinal BOLD foram relatadas em 1992. Kwong et al. [7] utilizaram ressonância magnética funcional para estudar a atividade no córtex visual utilizando estímulos alternados de luz. Ogawa et al. [8] também realizaram um estudo através de apresentação de estímulos visuais de longa duração. No mesmo ano, Bandettini et al. [9] relataram efeitos similares utilizando uma tarefa motora. Desde então, aplicações de fMRI utilizando estímulos sensoriais e motores têm sido realizadas em grande escala. Mais recentemente, estudos cognitivos também têm sido conduzidos baseando-se em imagens fMRI. No entanto, aplicações cognitivas são ainda um grande desafio (como discutido no capítulo 2).

Segundo Huettel et al. (2004) [1], pesquisadores têm utilizado fMRI buscando responder questões em uma diversa gama de disciplinas, incluindo neurociência cognitiva, psicologia, neurobiologia, psiquiatria, entre outras.

1.2- Objetivos

Este trabalho de doutorado faz parte de um projeto envolvendo duas linhas de pesquisa desenvolvidas em trabalhos de pós-doutorado. A primeira linha relaciona-se à aquisição de imagens fMRI com estímulos de memorização e a segunda linha relaciona-se ao acoplamento de fMRI a EEG para detecção de espículas inter-ictais em pacientes de epilepsia. As aquisições relacionadas às duas linhas de pesquisa foram realizadas conjuntamente pelo grupo, envolvendo os mesmos pacientes e controles.

Na linha de pesquisa de memória tem-se como objetivo investigar a ativação cerebral relacionada ao processo normal de memorização bem como a possibilidade de alterações no padrão de ativação em pacientes com epilepsia do lobo temporal medial (ELTM).

Durante a aquisição das imagens foram utilizados estímulos (palavras e figuras abstratas), apresentados através de projeção visual. A aplicação dos estímulos e orientação dos indivíduos participantes foram planejados para se estudar processos relacionados às fases de codificação, evocação imediata, evocação tardia e reconhecimento relacionados a memória verbal e visual.

Neste trabalho de doutorado teve-se como objetivo a realização de análises de imagens fMRI adquiridas mediante a aplicação de estímulos de memória verbal, comparando-se resultados de diferentes abordagens.

Este é um trabalho híbrido, orientado a questões relacionadas aos métodos de análise e a questões relacionadas a aplicações.

Em relação a métodos, as seguintes questões foram abordadas:

- Análise de grupo: Pré-processamento individual e pré-processamento em grupo; Análise concatenada e análise da média dos indivíduos;
- Análise de regiões de interesse: Utilização de suavização; Adequação da utilização de *templates* Efeito das dimensões das regiões de interesse nos resultados da ativação;
- Comparação de resultados das análises *voxel a voxel* e análise de regiões de interesse;
- Estudo da melhor forma de utilização de contrastes na análise do experimento realizado.

Em relação a aplicações, as seguintes hipóteses foram investigadas:

- 1) Através do paradigma de memorização estudado, há diferença significativa de ativação regional nos pacientes ELT em relação aos controles considerados?
- 2) Há diferença significativa de ativação hipocampal entre as fases de codificação e evocação mediante estímulos verbais / visuais?
- 3) Há diferença significativa de ativação entre sub-regiões do hipocampo em diferentes etapas do processo de memorização?
- 4) Qual é o envolvimento das estruturas anatômicas consideradas no processo de memorização verbal estudado?

O trabalho consistiu na participação dos processos de planejamento, estudo de fMRI, aquisição, processamento e análise das imagens através de diferentes abordagens. São descritos resultados específicos obtidos através da análise de regiões de interesse e a comparação entre diferentes abordagens bem como dificuldades encontradas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aplicações específicas para estudar o relacionamento entre a estrutura cerebral e diferentes processos cognitivos têm crescido rapidamente, através da integração de diversos recursos: imagens anatômicas possibilitam a realização de estudos de alta resolução de estruturas cerebrais e suas conexões *in vivo*; imagens funcionais possibilitam investigações da especialização de áreas cerebrais específicas e suas interações em redes que suportam funções psicológicas; estudos sobre sistemas de neurotransmissão e neuromodulação em funções cognitivas proporcionam bases para estudos aplicados.

Segundo Nobre et al. (2004) [10], a utilização de imagens de ressonância magnética tem revolucionado estudos relacionados à cognição. No entanto, a aplicação de neuroimagem em estudos cognitivos ainda consiste em um tópico sob investigação, sendo ainda um desafio em vários aspectos, apesar da quantidade crescente de aplicações que vem sendo desenvolvidas. Algumas destas dificuldades são discutidas na seção 2.1. Na seção 2.2 são discutidos alguns trabalhos que envolvem neuroimagem funcional aplicada ao estudo de memória e epilepsia. Na seção 2.3 são discutidas questões sobre a associação de anatomia a função, abordando mais especificamente a questão da análise de regiões de interesse em imagens funcionais.

2.1- Estudos funcionais em cognição

O campo da neurociência cognitiva envolvendo técnicas de imagem funcional tem apresentado um crescimento explosivo ao longo dos últimos 15 anos, o que pode ser verificado pelo grande número de publicações recentes na área, pela formação de novas sociedades e grupos de estudo multidisciplinares e pelo aumento do número de eventos com objetivo específico de estudos em neurociência cognitiva .

De acordo com Raichle (2003) [11], com as novas técnicas de imagem, pesquisadores interessados na função do cérebro humano têm se deparado com uma oportunidade sem precedentes para investigar correlações neurobiológicas de comportamentos humanos. O campo de neurociência cognitiva combina estratégias experimentais de psicologia com diversas técnicas utilizadas para examinar como as funções cerebrais suportam atividades mentais.

A possibilidade de se observar características do cérebro humano em funcionamento fascina pesquisadores e o interesse pela neurociência cognitiva tem se estendido também ao público geral por envolver questões abrangentes a todos (como memória, atenção, linguagem, motivação, emoção, tomada de decisões e a própria consciência). Apesar da difusão do tema, alguns pesquisadores têm questionado o potencial das técnicas envolvidas em fornecer análises da função cerebral que sejam suficientemente refinadas para verdadeiramente auxiliar o entendimento entre comportamento humano e função cerebral, como pontuaram Nichols e Newsome em 1999 [12]. Assim, na última década, muitos estudos relacionados ao desenvolvimento de novas técnicas e à integração de técnicas complementares à neuroimagem funcional têm sido direcionados ao aprimoramento de métodos existentes.

Algumas dificuldades no estudo da cognição através de técnicas de neuroimagem funcional estão relacionadas a fatores técnicos (como discutidos na seção 2.1.1). Outras dificuldades relacionam-se a questões inerentes à complexidade inerente ao estudo da cognição (como discutido na seção 2.1.2).

2.1.1- Dificuldades técnicas

Estudos anatômicos e funcionais relacionados a estruturas do lobo temporal têm recebido muito interesse da comunidade científica em neurociência. Neste trabalho, o lobo temporal medial tem sido um alvo importante, pois suas estruturas estão envolvidas em processos relacionados à memória e podem ser particularmente afetadas em decorrência de ELTM.

No entanto, a utilização de fMRI para a detecção de ativação na investigação de características funcionais de estruturas localizadas no lobo temporal, especialmente na região medial, tem sido um desafio em pesquisas da área. Diferentes fatores parecem contribuir para esta dificuldade, entre os quais pode-se destacar:

- 1) O lobo temporal medial (LTM) é formado por estruturas profundas. A distância à superfície faz com que haja distorções significativas devido a inhomogeneidades do campo magnético, resultando em uma menor relação sinal/ruído.
- 2) A utilização de técnicas simples para a normalização espacial do cérebro de diferentes indivíduos para um espaço padrão (com o objetivo de realizar-se análises e comparações entre grupos) pode resultar em distorções anatômicas que parecem ser mais acentuadas nesta região.

Sobre a questão da detecção de ativação no LTM, um estudo realizado por Wagner et al. (2005) [13] comparou a ativação avaliada a reprodutibilidade de padrões de ativação em imagens adquiridas utilizando codificação e reconhecimento de associações de pares de palavras. As aquisições foram repetidas no mesmo dia e após 1 ano. Foram calculadas medidas de confiabilidade para os contrastes de codificação e reconhecimento *versus* uma condição de controle no cérebro inteiro e em uma região envolvendo apenas o LTM. As medidas de reprodutibilidade obtidas em análises do cérebro todo demonstraram valores significativamente mais altos em comparação com as análises realizadas na região de interesse temporal. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na reprodutibilidade em relação ao processo de memória considerado (codificação ou reconhecimento).

Em hipóteses propostas pelos autores, uma razão para a baixa reprodutibilidade na detecção de ativação restrita ao LTM pode estar relacionada à anatomia de suas estruturas. Devido à proximidade a ossos e cavidades, a susceptibilidade a artefatos magnéticos pode frequentemente resultar em distorções ou eliminações nas imagens. Efeitos de volume parcial devido ao tamanho do voxel podem ter maior influência no hipocampo (devido à sua forma peculiar). Os autores sugerem que a diminuição do tempo de eco (TE) na aquisição das imagens e o aumento do número de *scans* por condição possibilitariam um aumento na relação sinal/ruído e conseqüentemente uma melhor reprodutibilidade na detecção de ativação no LTM.

Quanto à importância do hipocampo na formação da memória e o interesse crescente na utilização de técnicas de imageamento funcional nesta área, Eichenbaum (2004) destacou que mesmo as técnicas recentes ainda apresentam resolução anatômica insuficiente para diferenciar entre sub-regiões de poucos milímetros do hipocampo e regiões circunvizinhas. Segundo o autor, as estruturas estão muito próximas espacialmente e são altamente interconectadas, o que dificulta a detecção de ativação.

Ainda, a maioria dos estudos fMRI que detectam alterações funcionais em estruturas do LTM em estudos de memória (notavelmente no hipocampo), emprega normalização espacial para localizar os indivíduos em espaços padronizados por *templates* em passos prévios à análise. Contudo, segundo Krishnan et al. (2006) [14], pouco é conhecido sobre os efeitos de atrofia locais no processo de normalização em estruturas como o hipocampo. No estudo realizado pelos autores, regiões hipocâmpais bilaterais foram segmentadas manualmente e divididas em regiões anterior e posterior. Comparações foram realizadas pré e pós normalização e os resultados mostraram maiores imprecisões decorrentes da normalização em indivíduos que apresentavam comprometimento cognitivo em relação aos controles, principalmente nas porções posteriores do hipocampo (bilateralmente).

2.1.2- Dificuldades intrínsecas

Segundo Sugiura et al. (2007) [15], no cérebro humano, múltiplos mecanismos neuronais são recrutados para a realização de um objetivo comportamental simples, dos quais alguns podem ser até não essenciais ou incidentais. Esta redundância, segundo os autores, traz vantagens comportamentais, pois possibilita adaptações individuais de acordo com o ambiente. Por outro lado, em consequência desta variabilidade, há uma grande complexidade em estudos que utilizam imagens funcionais adquiridas durante tarefas cognitivas, pois efeitos individuais podem ser tratados como ruídos. A neuroimagem funcional busca associar diferentes processos mentais a diferentes partes do cérebro, visando criar mapas de quais áreas são responsáveis por quais processos. A pesquisa

moderna em neurociência considera que as funções cerebrais relacionam-se a redes distribuídas e que uma mesma região pode participar de mais de uma função.

Segundo Damasceno (2004) [16], todo ato mental (como a percepção de um objeto, enunciado verbal, resolução de um problema) é executado por um "sistema funcional complexo", também concebido como "rede neurofuncional", "representação distribuída em paralelo e em série" e como "modelo de esboços múltiplos", que se constitui de um conjunto dinâmico e interconexo de componentes psicológicos (volitivos, afetivos, cognitivos) e de regiões cerebrais, cada uma delas contribuindo com operações básicas para o funcionamento do sistema ou ato como um todo.

Assim, a análise de imagens funcionais obtidas mediante a aplicação de estímulos visando a realização de estudos relacionados à cognição humana constitui-se ainda hoje em um grande desafio.

2.2- Aplicações de neuroimagem funcional

2.2.1- Estudos relacionados à memória

Ainda antes do advento da fMRI, estudos foram realizados sobre o envolvimento de estruturas anatômicas em sistemas de memória. Em 1991, um artigo da revista Science (Squire e Zola-Morgan, 1991 [17]) discutiu estudos de amnésia humana e modelos animais que identificaram componentes anatômicos do lobo temporal medial que fariam parte de um "sistema de memória". Este sistema neural consistiria do hipocampo e córtex adjacente relacionado anatomicamente, incluindo córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal. Estas estruturas, presumivelmente em virtude de sua difusão e conexões recíprocas com o neocórtex, seriam essenciais para o estabelecimento de memória de longo prazo para fatos e eventos (memória declarativa) e seriam necessárias para interligar locais de processamento distribuído para representar a memória como um todo.

Em 1999, um estudo conduzido por Heun et al [18] teve como objetivo identificar estruturas cerebrais associadas com a codificação e recuperação de material verbal através de fMRI. Os autores compararam a ativação relacionada ao reconhecimento

de palavras novas e já apresentadas (mostradas de forma alternada aleatoriamente). A codificação de palavras foi associada com atividade aumentada no giro frontal inferior esquerdo (incluindo a área de Broca) e no córtex de associação parietal esquerdo. A análise de dados relacionada a eventos revelou ativação do giro frontal médio direito, giro cingulado anterior direito e córtices de associação parietal durante o reconhecimento de palavras previamente apresentadas. As tarefas de decisão léxica (palavras em comparação com não-palavras) foram associadas com a ativação do córtex de associação parietal esquerdo.

Em 2002, Reber e colaboradores [19] buscaram investigar a teoria da especialização funcional em componentes anatômicos do lobo temporal medial (hipocampo e áreas corticais entorinal, perirrinal e parahipocampal) utilizando estímulos de apresentação de figuras e palavras. Neste estudo foram relatados aumentos de atividade no córtex parahipocampal direito durante a codificação de figuras e no hipocampo posterior e córtex hipocampal esquerdo durante a codificação de palavras.

Em 2003, Greicius e colaboradores [20] examinaram diferenças de ativação entre sub-regiões do hipocampo durante a codificação e recuperação de palavras e interpretaram seus achados no contexto de modelos previamente descritos na literatura - Moser e Moser (1998) [21] e Lepage et al. (1998) [22]. Os autores também investigaram o quanto a susceptibilidade a artefatos afeta a análise e interpretação da ativação hipocampal. Análises de ROIs e voxel a voxel foram realizadas, permitindo quantificar diferenças entre os aspectos anterior e posterior do hipocampo. Os autores detectaram ativação hipocampal significativa nas duas condições analisadas - codificação e recuperação. Os autores sugeriram também que os artefatos de susceptibilidade na base do crânio tiveram um efeito prejudicial significativo na interpretação de estudos prévios de memória com fMRI. Os dados encontrados sugeriram que tanto a codificação quanto a evocação de estímulos verbais ativaram mais fortemente as porções média e posterior do hipocampo que a porção anterior.

Em 2004, Eichenbaum [23] fez uma revisão do papel do hipocampo em processos cognitivos e representações neurais que fundamentam a memória declarativa. Nesta revisão foram mencionados estudos de análise neuropsicológica e de neuroimagem.

Segundo o autor, o hipocampo está criticamente envolvido na codificação rápida de eventos e no relacionamento de episódios a características comuns em redes relacionais que suportam inferências flexíveis. Os detalhes de representações de memória estão provavelmente contidos em áreas espalhadas do córtex, tal que as propriedades da memória declarativa envolvem uma combinação de processamento hipocampal e cortical. A ativação da rede hipocampal-cortical de forma repetida durante treino, recordação e novas experiências relacionadas, bem como durante períodos de repouso, poderia fornecer as bases para um período prolongado de organização e consolidação de memórias no córtex cerebral.

Em 2005, Ranganath e colaboradores [24] utilizaram fMRI com desenho evento-relacionado para identificar áreas que apresentam conectividade funcional diferenciada com o hipocampo durante o processamento de novos objetos que foram subsequentemente recordados ou não segundo uma avaliação pós-aquisição. Os autores verificaram que a conectividade com o hipocampo esteve aumentada durante a formação de memória bem sucedida em uma rede distribuída de áreas corticais límbicas (incluindo córtex perirrinal, orbitofrontal e cíngulo retrosplenial posterior - áreas anatomicamente conectadas com a formação hipocampal). A conectividade aumentada foi também observada no córtex occipital medial, parietal médio e temporal lateral. Segundo os autores, os resultados sugerem que a formação de memória bem sucedida é associada a acréscimos transitórios na interação córtico-hipocampal.

Em 2007, Eichenbaum e colaboradores [25], em um estudo de reconhecimento de estímulos, revisaram evidências para a distinção entre recordações e familiaridade. Segundo os autores, evidências de estudos neuropsicológicos, de neuroimagem e neurofisiologia em humanos, macacos e ratos indicam que diferentes sub-regiões do LTM têm contribuições distintas para a recordação e familiaridade. Os dados sugeriram que o hipocampo seria crítico para recordações mas não para familiaridade. O córtex parahipocampal também contribuiria para a recordação, possivelmente via representação e recuperação de informação contextual (principalmente espacial), enquanto o córtex perirrinal contribuiria para o reconhecimento baseado em familiaridade. Segundo os autores, os achados são consistentes com uma hipótese anatomicamente guiada sobre a

organização funcional do LTM e sugerem mecanismos pelos quais os componentes anatômicos do LTM interagem para suportar os fenômenos de recordação e familiaridade.

2.2.2- Estudos relacionados à epilepsia

Binder et al (2002) [26] fizeram uma revisão de aplicações de fMRI no estudo de epilepsia, abordando métodos e aplicações, com ênfase na identificação de sistemas motores, linguagem e sistemas de memória considerados mais susceptíveis a riscos em tratamentos cirúrgicos de casos de epilepsia refratária. Segundo os autores, estudos fMRI de memória em ELT representam uma aplicação clínica ideal para esta nova modalidade e fornecem um modelo excelente para a validação de técnicas específicas.

Déficits de memória têm sido observados em ELTM e estudos recentes indicam que esta deficiência pode ser prevista pela perda de células granulares hipocampais (Pauli et al., 2006 [27]). Estudos baseados em volumetria realizados em MRI estrutural têm tido bons resultados na comprovação da existência de atrofia hipocampais em pacientes ELTM (Carnevalle et al., 2003 [28], Rondina et al., 2002 [29]).

Ainda, pelo fato de muitos pacientes clínicos terem indicação para lobectomia temporal, existe a oportunidade de se avaliar as conseqüências de ressecções próximas a ativações focais. Como qualquer nova modalidade diagnóstica e terapêutica, a localização de memória por fMRI deve ainda ser cuidadosamente validada de uma forma prospectiva antes de ser usada na rotina clínica.

2.3- Relacionamento estrutura-função

Segundo Tzourio-Mazoyer et al. (2002) [30], "um dos maiores objetivos da pesquisa moderna em neurociência é estabelecer relacionamentos entre estruturas cerebrais e suas funções e reduzir a variabilidade anatômica e funcional que é considerável entre indivíduos".

Ainda, segundo Toosy et al. (2004) [31], um objetivo chave em neurociência é melhorar nosso entendimento entre função cerebral e estrutura.

A existência de relacionamentos entre as estruturas do cérebro humano e suas funções tem sido matéria de longos debates filosóficos e religiosos que se tornaram abertos a investigações à comunidade científica somente após o trabalho pioneiro de Broca no século 19. Nos dias de hoje, uma grande variedade de técnicas de mapeamento funcional e estrutural do cérebro têm sido disponibilizadas, graças a recentes desenvolvimentos de métodos de neuroimagem 3D, possibilitando a investigação sistemática destes relacionamentos em diferentes escalas (Tzourio et al., 1997 [32]).

Segundo Poldrack (2007) [33], em alguns estudos funcionais há necessidade de se investigar regiões de interesse específicas, devido a diferentes razões. Um dos objetivos é a exploração dos dados. Em desenhos complexos, com muitos níveis, pode ser difícil discernir o padrão de atividade através de diferentes condições utilizando apenas um mapa global. Nestes casos é útil a verificação do sinal em áreas de interesse descrito para cada condição do experimento ou descrito contra outras variáveis de interesse. Outro objetivo da utilização de ROIs é diminuir a quantidade de erros do tipo I (falsos positivos) devido à limitação dos testes estatísticos ao número de ROIs considerado. Regiões de interesse também podem ser utilizadas para se limitar a realização de testes a regiões que são funcionalmente definidas de acordo com outra informação (utilização de *scans* localizadores, como discutido no capítulo 3).

2.3.1- Análise de ROIs *versus* análise *voxel a voxel*

A técnica fMRI, assim como outros métodos de mapeamento cerebral, tem como objetivo a localização espacial de funções neurais. Assim, as técnicas de análise funcional visam a detecção de quais voxels (ou conjuntos de voxels) estão ativos acima de um determinado limiar durante uma tarefa (motora, sensorial ou cognitiva). Assim, independente do modo de análise - voxel a voxel ou baseado em regiões de interesse - o objetivo é o relacionamento localização - função. No entanto, métodos baseados em regiões de interesse adicionam um componente anatômico a esta análise.

Huettel et al. (2004) [1] destacam algumas vantagens da análise de ROI em relação à abordagem de análise *voxelwise* (ou voxel a voxel):

- 1) Redução significativa do número de comparações estatísticas a serem realizadas, diminuindo a necessidade de correções para múltiplas comparações;
- 2) Aumento da relação sinal/ruído (devido ao fato de que cada ROI combina dados de diferentes voxels). No entanto é importante observar que este aumento é proporcional à homogeneidade funcional das ROIs considerados. A sumarização espacial do sinal complementa a média temporal (que é realizada nas duas formas de análise);
- 3) Possibilidade de identificação de informações sobre a topografia cerebral (identificação de diferenças de ativação entre regiões de uma mesma fatia ou entre diferentes fatias na mesma região);
- 4) Em análises baseadas em segmentações individuais, a comparação de uma mesma região entre diferentes indivíduos reduz os problemas relacionados ao processo de normalização para um cérebro padrão.

No entanto, independente da abordagem considerada, há uma dificuldade inerente que impossibilita uma relação direta entre regiões anatômicas e funcionais de forma completa. A definição das áreas de Brodmann (1909) já se baseava na idéia de que regiões anatomicamente distintas provavelmente apresentam diferentes propriedades funcionais. Mas ainda hoje esta associação constitui um desafio. Pode-se definir ROIs que englobam diferentes componentes anatômicos de uma rede funcional. Da mesma forma, uma simples região anatômica pode conter múltiplas regiões funcionais.

Devido a estes fatores, alguns grupos de pesquisa têm considerado que uma combinação entre as duas abordagens (análise de ROIs e voxel a voxel) pode ser útil e poderosa. Uma possibilidade de combinação é usar ROIs anatômicas como fatores agrupantes comparando-se, em cada condição do experimento, os voxels identificados na abordagem "voxel a voxel" que ocorrem dentro das ROIs. Pode-se também remover voxels ativos e analisar-se o curso de tempo dos voxels restantes. Outra linha de investigações é a

criação de ROIs funcionais incluindo apenas voxels ativados por um estímulo em particular. Este tipo de abordagem é promissora em estudos onde se pretende investigar ativações resultantes de estímulos específicos restritos a uma ROI ativada por um estímulo mais geral (como por exemplo em aplicações de estudos retinotópicos através de diferentes estímulos visuais). Estas questões serão novamente abordadas nos capítulos 3 e 4.

Martin e Hanlon (2004) [34] propuseram um método que examina a co-variância em ROIs comuns entre indivíduos. Na aplicação de validação, 14 ROIs foram definidas para cada indivíduo usando parâmetros do Atlas de Damásio. Segundo o autor, a utilização de normalizações apresentaria dificuldades em estudos inter-indivíduos devido à heterogeneidade entre diferentes cérebros. Um meio de contornar as atividades associadas à transformação espacial de mapas funcionais para um espaço comum é desenhar manualmente ROIs anatômicas para cada indivíduo. Esta é uma atividade trabalhosa, sujeita a erros humanos e é baseada na suposição de que uma região ativa está dentro de um índice anatomicamente padronizado.

A utilização de ROIs também possibilita a realização de questionamentos sobre as redes de atividades distribuídas que compõem uma dada tarefa. Podem ser analisadas diferentes tarefas entre o mesmo conjunto de indivíduos ou então a mesma tarefa entre diferentes grupos.

Publicações recentes relatam a utilização de regiões de interesse aplicadas a estudos específicos. Algumas destas publicações são destacadas a seguir por relacionarem-se a este trabalho:

Reber et al. (2002) [19] utilizaram MRI estrutural de alta resolução para restringir a análise fMRI, para avaliação independente da alteração de atividade funcional em cada componente do LTM. Os autores argumentaram que a metodologia baseada anatomicamente provê comparação detalhada de níveis de alteração de atividade entre áreas específicas aumentando a sensibilidade a alterações funcionais em cada região do LTM. Conclusões foram obtidas sobre lateralidade na ativação cerebral mediante a apresentação de palavras e figuras e comparações entre áreas ativadas.

Vigneau et al. (2005) [35] investigaram o processamento verbal durante a leitura de palavras através da utilização de ROIs definidas como esferas de mesmo raio localizadas em regiões específicas selecionadas de acordo com estudos da literatura (área temporal média, área occipital inferior e uma ROI funcional chamado de VWFA (*visual word form area*)).

Rabin et al. (2004) [36] utilizaram ROIs definidas com base no atlas de Tailarach para quantificar a ativação dentro do hipocampo e na região denominada HPF (hipocampo, para-hipocampo e giro fusiforme) visando comparar resultados da análise fMRI durante a codificação de memória com testes clássicos para avaliação do valor preditivo pré-cirúrgico (para lobectomia temporal).

Tsukiura et al. (2005) [37] fizeram uma análise de ROIs para os hipocampus bilaterais e giro parahipocampal para avaliar a atividade cerebral durante o reconhecimento de palavras.

Moscovitch et al. (2005) [38] examinaram (através de revisão de lesões e de evidências de neuroimagem) o papel do hipocampo e outras estruturas na retenção e recuperação de memórias recentes e remotas. Na consideração de memória episódica, semântica e espacial, os autores sugerem que existem importantes distinções entre os diferentes tipos de memória e as estruturas que as mediam.

Segundo Greicius e Krasnow (2003) [20], resultados de análises de ROIs sugerem que, apesar dos artefatos de susceptibilidade, tanto a codificação quanto a recuperação de estímulos verbais ativam as porções média e posterior do hipocampo mais fortemente que a porção anterior.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritas características relacionadas ao planejamento do experimento realizado, à seleção de participantes, à aquisição de dados e aos métodos de análise envolvidos. São discutidas características iniciais bem como modificações introduzidas ao longo do desenvolvimento do trabalho buscando avaliar a implicação da utilização de diferentes abordagens nos resultados da análise.

3.1- Indivíduos participantes

Para participação na pesquisa foram selecionados pacientes previamente diagnosticados com epilepsia do lobo temporal medial (ELTM) que estão sendo acompanhados no Hospital das Clínicas da Unicamp. Todos os pacientes selecionados apresentaram atrofia hipocampal detectada em estudos prévios através de segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética anatômica. Os pacientes apresentaram também *déficit* moderado de memória detectado através de estudos neuropsicológicos realizados previamente.

Foram também selecionados indivíduos sem história prévia de alterações neurológicas e/ou psiquiátricas para compor um grupo controle. A seleção dos controles foi feita de forma pareada com os pacientes em relação a faixa etária, sexo, nível sócio-econômico e nível de instrução.

No momento da finalização deste trabalho, haviam sido adquiridas imagens de 27 indivíduos classificados em 3 grupos: 9 controles, 9 pacientes ELTM com atrofia hipocampal esquerda (AHE) e 9 pacientes com atrofia hipocampal direita (AHD). Todos os indivíduos participantes assinaram um formulário de consentimento para o estudo, aprovado pelo comitê local de ética em pesquisa (CEP-Unicamp).

3.2- Aquisição das imagens

As imagens foram adquiridas utilizando um equipamento de ressonância magnética com campo magnético de 2 Tesla (fabricante Elscint, modelo *Prestige*¹).

¹Haifa, Israel

3.2.1- Configurações de aquisição

Para a aquisição das imagens funcionais foi utilizado um protocolo EPI (*Echo Planar Imaging* - Edelman et al. (1994) [39]).

Os seguintes parâmetros foram utilizados:

- Tempo de repetição: 2 segundos
- Tempo de eco: 45 milisegundos
- Dimensão do pixel: 3 X 3 milímetros
- Espessura das fatias: 6 milímetros

Foram também adquiridas imagens anatômicas axiais ponderadas em T1, com 6 milímetros de espessura. Tanto as imagens funcionais quanto as anatômicas foram adquiridas em fatias na orientação axial.

Todos os pacientes haviam realizado previamente exames de ressonância magnética com protocolo para diagnóstico de epilepsia. Este protocolo incluiu imagens coronais T1-IR e T2 FSE com 3 milímetros de espessura, imagens axiais T1 e Flair com 4 milímetros de espessura e imagens 3D GRE (*Gradient-Echo*) com 1 milímetro de espessura para reconstrução multiplanar.

As palavras, figuras e mensagens foram apresentadas através de um canhão de projeção em um anteparo branco posicionado próximo à entrada do *scanner*. Acima da bobina que envolve a cabeça do paciente (*head coil*) foi posicionado um espelho cuja angulação foi cuidadosamente ajustada antes de cada aquisição para que o indivíduo pudesse enxergar a projeção de dentro do *scanner*. A figura 3.1 ilustra o aparato elaborado para a projeção dos estímulos.

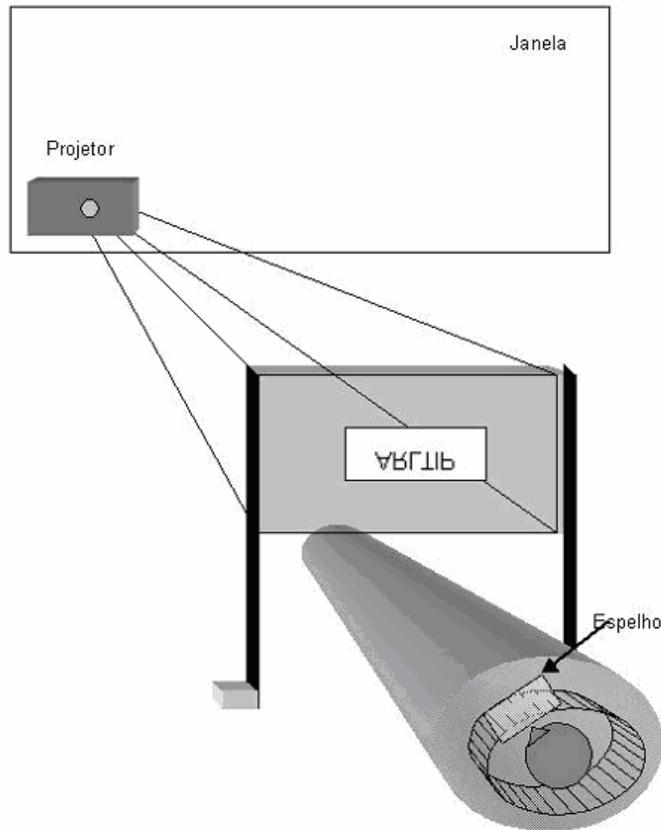


Figura 3.1- Projeção visual de estímulos

3.2.2- Projeto do experimento

Antes da aquisição das imagens funcionais é necessário organizar o experimento de forma a permitir o teste efetivo das hipóteses a serem pesquisadas. Neste planejamento do processo de aquisição são definidos os instantes de tempo em que serão apresentados estímulos e/ou tarefas a serem requisitadas a fim de se observar áreas de atividade cerebral mediante o comportamento do indivíduo durante os instantes de tempo da aquisição.

O projeto do experimento (referido frequentemente como desenho) é definido de acordo com um paradigma, consistindo em uma série de tarefas a serem apresentadas aos indivíduos com o objetivo de se observar áreas de atividade cerebral. Em linhas gerais, há três classes de paradigmas (Araújo, 2002 [3]):

- Em blocos (ou discretos) - alternam períodos de atividade (*on*) com períodos de repouso (*off*).
- Paramétricos (ou contínuos) - os estímulos são apresentados de forma contínua, às vezes aleatoriamente.
- Evento-relacionados (ou evento-único) - estímulos de curta duração são intercalados com períodos de repouso de longa duração.

Nas sequências de aquisição das imagens utilizadas neste trabalho foram utilizados componentes em bloco e paramétricos.

Em paradigmas em bloco, um conjunto de imagens são adquiridas sucessivamente, alternando-se períodos de atividade ("on") com períodos de repouso ("off"). Em paradigmas paramétricos, o efeito de uma determinada propriedade contínua do estímulo na atividade cerebral é monitorado[3].

O processo de aquisição completo consistiu de 4 seqüências de aquisição, sendo 2 de memória verbal (através de palavras) e 2 de memória visual (através de figuras).

- Seqüência 1) Memória verbal - codificação e evocação imediata
- Seqüência 2) Memória verbal - evocação tardia e reconhecimento
- Seqüência 3) Memória visual - codificação e evocação imediata
- Seqüência 4) Memória visual - evocação tardia e reconhecimento

Rpre	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	Rpos	EI
68s	34s	120s	60s								

Figura 3.2- Desenho da sequência de codificação e evocação imediata

D - Descarte

Rpre - Repouso pré-estímulo

NP - Não-palavra

P - Palavra

Rpos - Repouso pós-estímulo

EI - Evocação imediata

A figura 3.2 mostra o desenho da primeira sequência. O bloco Rpre corresponde à aquisição de 34 *scans* (68 segundos) em repouso. Os blocos NP e P (alternados) correspondem à aquisição de *scans* durante apresentação de estímulos verbais. Nos blocos NP é mostrada uma combinação de letras formando uma palavra não existente na língua portuguesa (ARLTIP). Nos blocos P é mostrada uma sequência de 17 palavras da língua portuguesa, consideradas de sentido abstrato e de conteúdo emocionalmente neutro. A figura 3.3 mostra a lista de palavras utilizadas. Cada palavra foi apresentada durante 2 segundos.

HONRA	OPINIÃO	PROBLEMA
DEVER	INTERESSE	PACIÊNCIA
ALMA	LEI	OPÇÃO
ACASO	SIMPATIA	ORGULHO
DECISÃO	CRITÉRIO	SISTEMA
VIDA	MÉTODO	

Figura 3.3- Palavras utilizadas como estímulo para a memória verbal

O bloco Rpos corresponde à aquisição de 60 *scans* (120 segundos) em repouso. O bloco EI é formado por 30 *scans* (60 segundos). Antes da aquisição o indivíduo é orientado para que durante este período tente se lembrar das palavras apresentadas anteriormente. A evocação é realizada em silêncio. No momento em que o indivíduo deve iniciar a evocação, é apresentada uma mensagem na tela: *Lembre as palavras*. Esta é uma evocação livre, considerando-se que durante este período não há apresentação de nenhum estímulo.

Após a seqüência de codificação / evocação imediata ocorre uma pausa de 30 minutos, nos quais são realizadas aquisições de fMRI simultâneas à aquisição de EEG, que faz parte do experimento de outro projeto relacionado, desenvolvido pelo grupo de pesquisa.

Em seguida é adquirida a seqüência 2 (evocação tardia / reconhecimento), mostrada na figura 3.4.

Rpre	NP	m1	ET	m2	REC	Rpos
136s	34s	4s	60s	4s	136s	20s

Figura 3.4- Desenho da seqüência de evocação tardia e reconhecimento

D - Descarte

Rpre - Repouso pré-estímulo

NP - Não-palavra

m1- Mensagem 1

ET - Evocação tardia

m2 - Mensagem 2

REC - Reconhecimento

Rpos - Repouso pós-evocação

Nesta seqüência a não-palavra é apresentada novamente (durante 34 segundos) e em seguida é apresentada a mensagem "Lembre as palavras" para que o indivíduo seja avisado de que a partir deste momento deve tentar se recordar das palavras apresentadas na seqüência anterior. O próximo bloco, chamado de Evocação Tardia (ET) tem a duração de 60 segundos e corresponde também a uma evocação livre (sem apresentação de estímulos). Em seguida é apresentada a mensagem "Aperte o botão". Esta mensagem introduz o bloco de reconhecimento (REC). Neste período (que tem duração de 136 segundos) são novamente apresentadas as palavras já vistas anteriormente, mas intercaladas aleatoriamente por outras palavras ainda não apresentadas. O indivíduo deve pressionar um botão quando reconhece uma palavra já apresentada anteriormente. Isso é realizado através de um *push-button* que fica posicionado na mão dominante do indivíduo desde o início da aquisição. Ao pressionamento do botão, uma luz é acesa e o experimentador anota a palavra reconhecida.

Após a aquisição das seqüências de codificação / evocação imediata e evocação tardia / reconhecimento para a memória verbal, estas duas seqüências são repetidas para a memória visual. O desenho é o mesmo mostrado nas figuras 3. e 3.4. No entanto, em vez de palavras são apresentadas figuras abstratas e em vez da não-palavra é apresentada uma cruz.

A representação do desenho completo é mostrada na figura 3.5.

Codificação												Evoc. Imed.	Evoc. Tardia				Rec.			
Lista de palavras			17 palavras		17 palavras		17 palavras		17 palavras			17 palavras				17 palavras		34 palavras		
Linha de base		não-palavra		não-palavra		não-palavra		não-palavra		não-palavra	(reposo)	lembre as palavras	(REPOUSO)		não-palavra	lembre as palavras	lêse o botão			
	SAT OFF										4s	4s		SAT OFF		4s	4s		POFF	
Tempo	20s	68s	34s	120s	60s	1800s	20s	136s	34s	60s	4s	136s	20s							
											T= 574s	T= 1800s								T= 410s
Tempo Total = 46,4 n																				

Figura 3.5- Desenho completo do experimento

O projeto dos experimentos foi baseado em Dupont et al. [40].

3.3- Reconstrução das Imagens

Reconstrução ² é o processo de transformação do sinal FID (*Free Induction Decay*) em uma imagem. Em imagens anatômicas, este processo tem como principal objetivo tornar a imagem tão nítida quanto possível para o diagnóstico clínico. Em imagens funcionais, o principal objetivo é tornar os dados favoráveis para a análise computacional subsequente (Holgersson e Sväd, 2004)[41]. Neste processo, a redução de artefatos devido a inhomogeneidades de campo é fundamental.

Os dados adquiridos neste trabalho foram reconstruídos inicialmente utilizando o *software* proprietário do equipamento de aquisição Elscint. Devido a artefatos observados nas imagens resultantes das primeiras análises, utilizou-se um novo método de reconstrução desenvolvido localmente usando-se a linguagem Matlab (Zibetti M, 2007; dados não publicados).

A figura 3.6 ilustra a transformação de FIDs em imagens em uma seqüência de codificação / evocação imediata de 1 indivíduo. Os dados adquiridos pelo *scanner* são armazenados originalmente em 20 arquivos FID de formato proprietário do equipamento, cada um contendo dados de todos os instantes de tempo referentes a uma das 20 fatias no espaço. O resultado da reconstrução das imagens de uma seqüência de codificação / evocação imediata de 1 indivíduo consiste de 5800 imagens 2D no formato padrão DICOM (*Digital Imaging Communications in Medicine* ³).

Após o processo de reconstrução é realizada a reorganização temporal das imagens. Na saída da reconstrução as imagens estão agrupadas por fatias (ou seja, cada arquivo DICOM é formado por todos os instantes de tempo de uma fatia). Para que sejam utilizadas pelo programa computacional de análise estas devem ser agrupadas por instantes de tempo (com cada arquivo contendo todas as fatias adquiridas em um mesmo instante de tempo).

²O termo *reconstrução* é utilizado em neuroimagem também com outro sentido. *Reconstrução volumétrica* é o processo de visualização tridimensional do cérebro a partir de imagens bidimensionais.

³<http://medical.nema.org/>

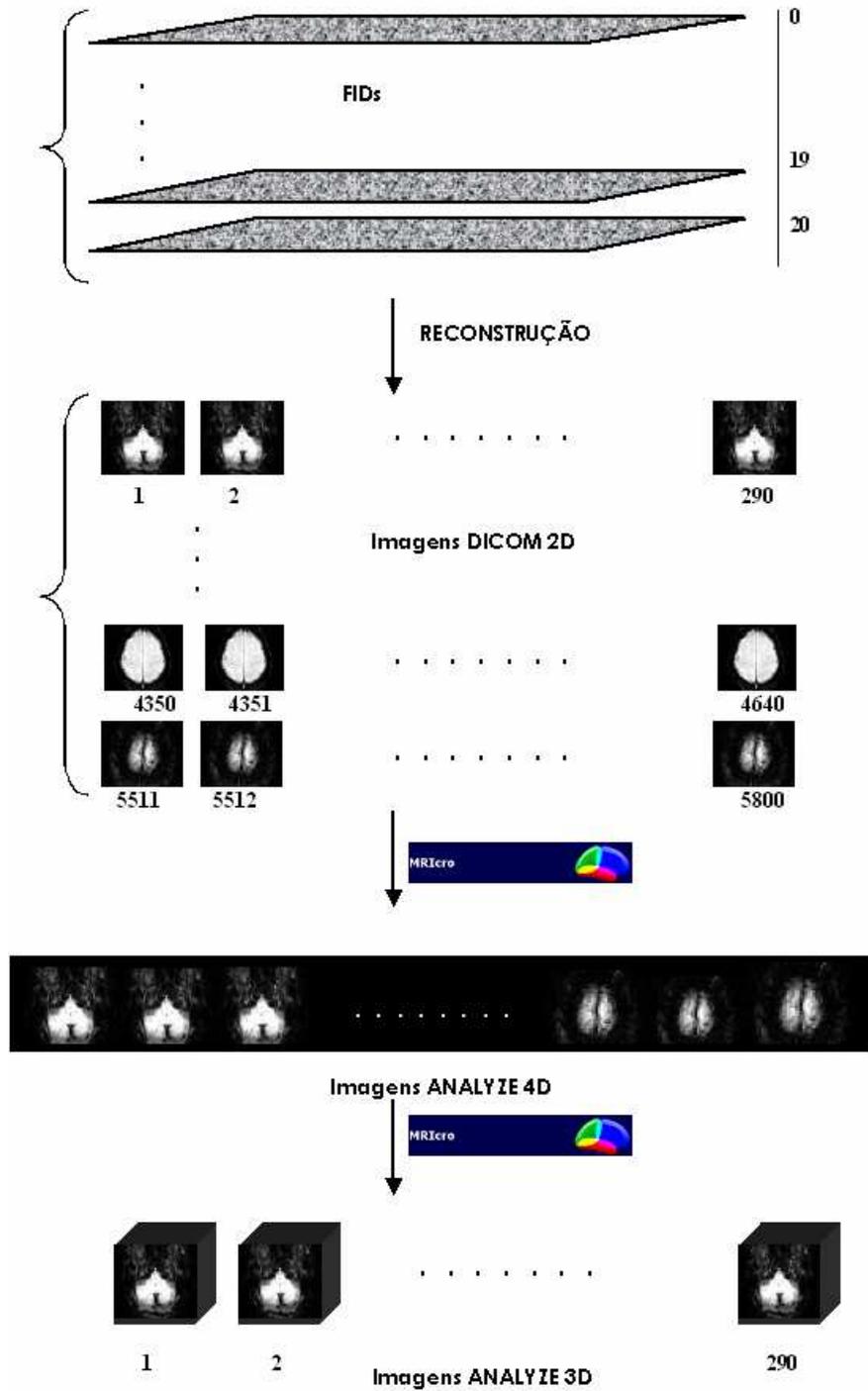


Figura 3.6- Organização espaço-temporal na reconstrução e conversão de uma sequência de codificação / evocação imediata

3.4- Pré-processamento

Os procedimentos realizados após a reconstrução das imagens e antes da análise são comumente chamados de pré-processamento. O objetivo de sua utilização é reduzir a variabilidade não associada à tarefa experimental e preparar os dados para testes estatísticos (Huettel et al., 2004) [1]. Em geral, dados fMRI contêm imprecisões espaciais e temporais originadas durante a aquisição do sinal devido a movimentos da cabeça, oscilações fisiológicas (cardíacas e respiratórias), inomogeneidades de campo magnético e diferenças de temporização entre a aquisição de diferentes fatias em um mesmo instante de tempo. A variabilidade decorrente destes fatores pode reduzir (ou até eliminar) o poder de detecção de ativações. As correções realizadas nos procedimentos de pré-processamento visam reduzir o efeito desta variabilidade.

Na sequência de pulsos utilizada, a aquisição foi feita no modo *interleaved*, no qual o *scanner* adquire inicialmente todas as fatias ímpares e depois todas as fatias pares. Na aquisição sequencial as fatias são adquiridas consecutivamente (de forma ascendente ou descendente). A figura 3.7 ilustra a ordem recomendada para a realização dos procedimentos de pré-processamento, de acordo com a forma de aquisição.

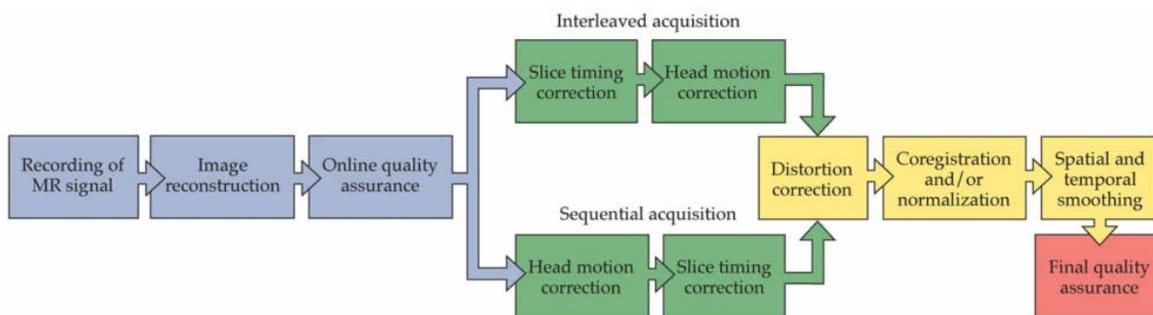


Figura 3.7- Pré-processamento (Scott Huettel et al. [1], figura disponibilizada com permissão em <http://www.biac.duke.edu/education/courses/fall05/fmri>)

Neste trabalho, os procedimentos de pré-processamento das imagens foram realizados utilizando recursos do pacote de *software* SPM2 - *Statistical Parametric Mapping* ⁴.

As imagens foram reorganizadas espacialmente (como ilustra a figura 3.6). Em seguida, foram transformadas para o formato Analyze ⁵ e convertidas para imagens 3D utilizando o *software* MRIcro ⁶. O objetivo desta conversão foi sua utilização no software SPM2, que trabalha com o formato Analyze .

A verificação da qualidade antes do pré-processamento foi realizada através de checagem visual das imagens reconstruídas após sua conversão para o formato Analyze. A verificação da qualidade final foi feita através da visualização das imagens suavizadas e da análise dos gráficos resultantes dos passos de pré-processamento.

Utilizando o software SPM2, foram realizados os seguintes passos de pré-processamento:

Correção temporal

A maioria dos dados fMRI é adquirida através da utilização de seqüências de pulso que geram imagens de uma fatia por vez. A aquisição deve ser rápida (por exemplo, 20 fatias (1 volume) em 2 segundos, como no caso das aquisições realizadas neste trabalho). Independente da ordem de aquisição (*interleaved* ou sequencial), cada fatia é adquirida em um instante de tempo diferente dentro de um mesmo período TR (tempo de repetição).

Para a correção desta diferença de tempo, uma possibilidade é modificar a predição das respostas hemodinâmicas para que cada fatia seja comparada a uma função com temporização ligeiramente diferente. Mas o mais comum é a correção por interpolação temporal, utilizando informação de pontos de tempo aproximados para estimar a amplitude do sinal no início do TR.

⁴<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>

⁵<http://www.mayo.edu/bir/PDF/ANALYZE75.pdf>

⁶<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden>, RORDEN e BRETT, 2000

Diferentes estratégias de interpolação podem ser utilizadas, através de funções lineares e *splines*. Neste trabalho foi utilizada a função de interpolação *B-spline* de quarta ordem utilizando como referência a fatia de número 19.

Realinhamento

A movimentação da cabeça durante a aquisição das imagens ocorre com frequência, mesmo com sua fixação através de aparato adequado (especialmente em experimentos de longa duração, como o realizado neste trabalho). O efeito do deslocamento das imagens decorrente desta movimentação é um fator que pode prejudicar significativamente os resultados da análise em estudos fMRI. Desta forma, o realinhamento é um procedimento essencial no pré-processamento das imagens.

O objetivo da correção de movimento é ajustar as séries de tempo de forma que o cérebro esteja na mesma posição em cada imagem. Para esta correção, sucessivos volumes de imagens em uma série temporal são co-registrados para um volume de referência. Pelo fato de que o cérebro é o mesmo em cada imagem da série temporal, uma transformação de corpo rígido pode ser realizada (Huettel et al., 2004) [1]. Neste tipo de transformação se considera que o tamanho e a forma de dois objetos a serem co-registrados são idênticos e que um pode ser exatamente superposto a outro por uma combinação de três translações (ao redor dos eixos x, y e z) e três rotações (ao redor dos planos x-y, x-z e y-z).

Normalização

O cérebro humano tem uma morfologia bastante variável. Em relação ao tamanho, o cérebro adulto tem em média 1300 cm^3 de volume (com variações de cerca de $\pm 200 \text{ cm}^3$). Assim, o tamanho do cérebro de diferentes indivíduos em um mesmo experimento pode diferir em até cerca de 30%. Há também variação substancial na forma cerebral. As diferenças podem ser especialmente críticas em algumas regiões particulares. A organização dos giros e sulcos é bastante variável e mesmo marcas de referência (como o sulco calcarino, por exemplo) podem ter posições e orientações diferentes entre indivíduos.

O objetivo da normalização é compensar estas diferenças através de transformações espaciais de compressão, dilatação e ajustamento de cada cérebro. Neste processo são estimados parâmetros para o mapeamento das imagens para um espaço anatômico padrão. Neste trabalho, esta estimativa foi feita através da imagem média da série temporal. Outra opção seria utilizar uma imagem anatômica co-registrada.

A normalização dos dados de diferentes indivíduos participantes de um mesmo estudo para um mesmo espaço padrão permite a combinação destes dados em grupos de indivíduos. Ainda, se os dados entre diferentes estudos forem normalizados da mesma maneira, então as áreas de atividade encontradas podem ser comparadas. O espaço padrão mais usado é o de Talairach (Talairach e Tournoux, 1988) [42]. Este *template* é baseado em medições de um cérebro único. Outra abordagem possível é a utilização de espaços probabilísticos baseados na combinação de dados de centenas de *scans* individuais. O *template* MNI152 (desenvolvido no Montreal Neurological Institute) consiste de uma média de 152 imagens cerebrais T1. Os algoritmos de normalização utilizados no pré-processamento fornecido na maioria dos pacotes de *software* de análise fMRI são baseados em templates probabilísticos.

Suavização

Como último passo de pré-processamento, as imagens já corrigidas temporalmente, realinhadas e normalizadas são também suavizadas. Este processo é feito para que a escala espacial da resposta hemodinâmica seja condizente com a resolução espacial das imagens. Neste trabalho foi feita suavização de 6 milímetros.

Filtros são usados em imagens para remover variações nos dados que possam ser atribuídas de forma razoavelmente segura a fontes de ruídos, visando, no entanto, preservar os sinais de interesse. O objetivo da filtragem é aumentar a relação sinal/ruído. Em muitas análises fMRI, filtros espaciais passa-baixa são empregados para reduzir os componentes de baixa frequência.

As desvantagens da filtragem espacial resultam de associações inadequadas entre a dimensão do filtro e a extensão da ativação. Se o filtro usado for muito grande, ativações significativas podem ser atenuadas abaixo do limiar para significância estatística estabelecido. Isso é especialmente problemático para estruturas funcionais que são muito pequenas, núcleos onde pode haver até mesmo um único voxel significativo.

3.5- Análise

As imagens resultantes da aquisição fMRI são formadas por valores numéricos que representam as intensidades de cada voxel a cada instante de tempo. Assim, cada voxel é associado a uma série temporal. A ativação é calculada de acordo com o ajuste das séries temporais ao modelo estabelecido *a priori*.

A alteração no sinal de ressonância magnética disparada pela atividade neuronal é chamada de **resposta hemodinâmica**. A figura 3.8 mostra a representação esquemática da resposta hemodinâmica BOLD para um evento único de curta duração e para um bloco contínuo de eventos consecutivos obtidos por um estímulo mantido. O sinal BOLD em um voxel reflete a quantidade total de hemoglobina desoxigenada que está presente, assim como o ruído associado. Após uma curta latência, as demandas metabólicas de atividade neuronal aumentada acima do nível de base resultam em um influxo aumentado de sangue oxigenado. Mais oxigênio é fornecido para a área ativada, resultando em um decréscimo na quantidade de hemoglobina desoxigenada dentro do voxel. O sinal BOLD no voxel aumenta acima do nível de base em aproximadamente 2 segundos após o início da atividade neuronal, aumentando para um valor máximo (*Rise* na figura) em aproximadamente 5 segundos(em um estímulo de curta duração). Este valor máximo é considerado o pico da resposta hemodinâmica (*Peak* na figura). Se a atividade neuronal é estendida durante um bloco de tempo, o pico pode ser estendido em um *plateau*. Depois de alcançar o pico, o sinal BOLD decresce em amplitude até um nível abaixo da linha de base durante um intervalo de tempo. Este efeito é chamado de *undershoot* pós-estímulo. Para informações mais detalhadas sobre o efeito BOLD, o leitor pode consultar Huettel et al. (2004) [1].

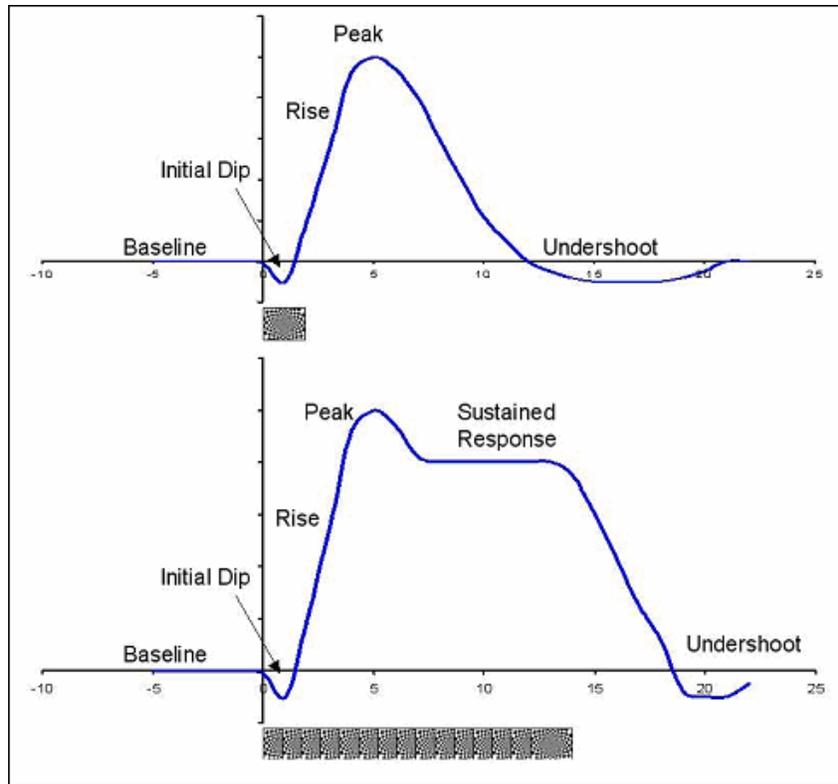


Figura 3.8- Representação da resposta hemodinâmica BOLD (<http://www.biac.duke.edu/education/courses/fall05/fmri/>)

Após o contraste das intensidades no período relacionado à tarefa comparado ao período considerado como condição de controle, resultados numéricos são obtidos (normalmente através da subtração entre as médias dos períodos considerados). No entanto, o objetivo não é verificar simplesmente se a atividade funcional foi maior no bloco de tarefa do que no bloco de controle. É preciso também verificar se a diferença entre estas condições foi significativa. Assim, recursos de estatística são utilizados para prover estimativas sobre a hipótese do experimento. Testes de significância são utilizados para analisar qual a probabilidade de que as diferenças encontradas entre as condições sejam provenientes ou não do acaso.

Uma forma comum de comparação entre duas condições (por exemplo, condição A vs condição B) é o cálculo da diferença entre suas médias (ou seja, calcula-se a média das intensidades do voxel ao longo de todos os instantes de tempo que compõem o período da condição A e subtrai-se da média calculada para o período da condição B).

Fundir os dois parágrafos anteriores

Em seguida é necessário avaliar o resultado da subtração no contexto de sua variabilidade. Uma forma possível é a utilização da distribuição t (que descreve a diferença esperada entre duas amostras obtidas da mesma distribuição), através da divisão da diferença entre as médias pelo desvio padrão:

$$t = \frac{\bar{A} - \bar{B}}{\sigma_{AB}}$$

O resultado é convertido para um valor de probabilidade baseado no número de graus de liberdade (número de instantes de tempo da sequência 1). Normalmente um limiar é estabelecido e o voxel é considerado ativado se a probabilidade da hipótese nula for menor que o limiar.

Para a visualização dos resultados da análise, freqüentemente são utilizados mapas de cores que expressam esta probabilidade. Em geral, cores mais quentes representam mais baixa probabilidade da hipótese nula (ou seja, correspondem a áreas de maior probabilidade de ativação). A figura 3.9 ilustra a visualização de um resultado de ativação fMRI.

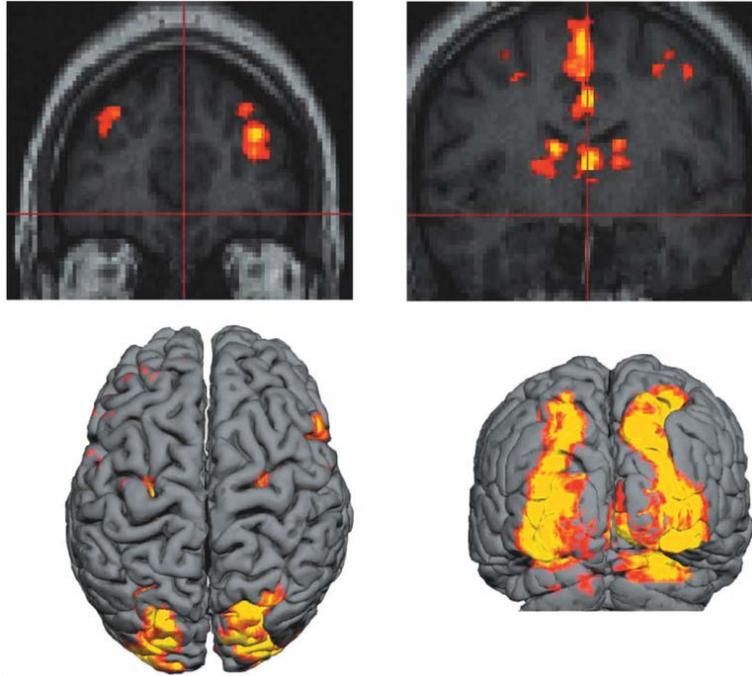


Figura 3.9- Utilização de mapas de cores para visualização de probabilidade de ativação (Scott Huettel, figura disponibilizada em <http://www.biac.duke.edu/education/courses/fall05/fmri/>)

A análise voxel a voxel foi realizada utilizando o *software* SPM, baseado na caracterização de respostas hemodinâmicas por abordagem multivariada (proposta por Friston et al., 1995 [43]). A análise de ROIs foi realizada utilizando o *software* MarsBar, também baseado na abordagem implementada no SPM.

3.5.1- Definição do modelo

A definição do desenho a ser utilizado na análise fMRI é o procedimento realizado para se especificar o modelo contra o qual as séries temporais de cada voxel (ou de cada região de interesse) serão contrastadas.

A figura 3.10 mostra o desenho definido para uma seqüência completa de codificação / evocação imediata, incluindo 5 condições (também chamados de blocos ou épocas): repouso pré-estímulo (Rpre), não-palavra (NP), palavra (P), repouso pós-estímulo (Rpos) e evocação imediata (EI). Os *onsets* (instantes de início dos blocos) e as durações estão definidos de acordo com o número do *scan* dentro da seqüência. Esta figura foi obtida utilizando-se o *software* SPM2 que faz uma convolução do desenho e da resposta hemodinâmica predita.

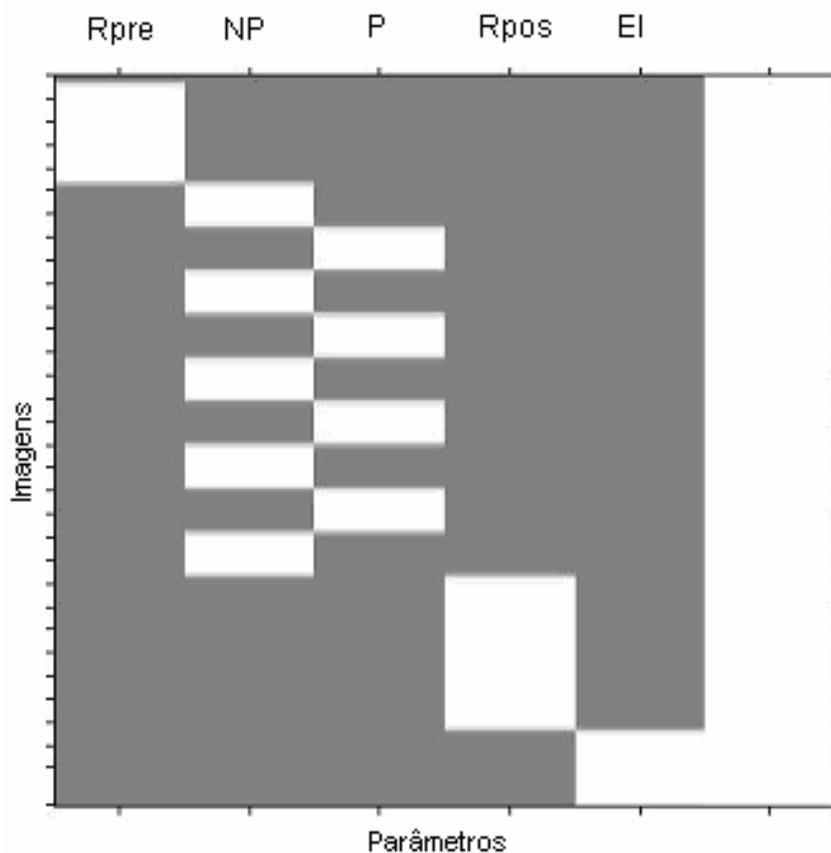


Figura 3.10- Desenho do modelo definido com 5 condições - Repouso pré-estímulo, Não-palavra, Palavras, Repouso pós-estímulo e evocação imediata

As figuras 3.11, 3.12 e 3.13 ilustram a utilização de recortes de condições específicas para o desenho do modelo.

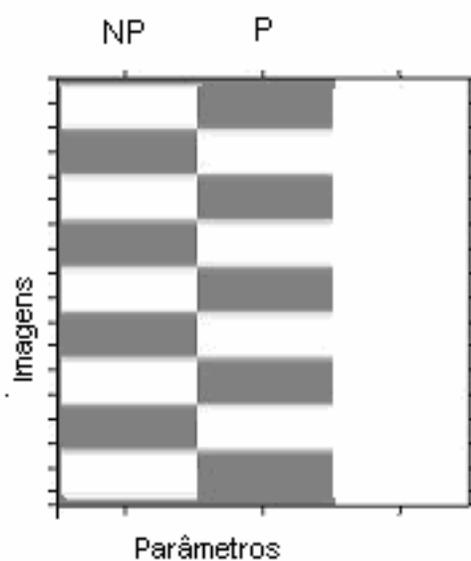


Figura 3.11- Desenho do modelo definido com as condições - Não-palavra e Palavras

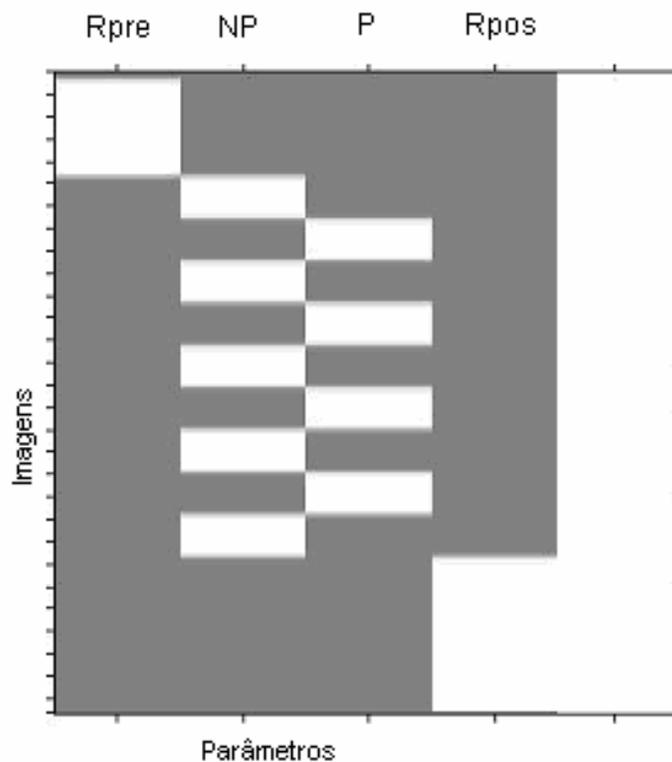


Figura 3.12- Desenho do modelo definido com as condições - Repouso pré-estímulo, Não-palavra, Palavras e Repouso pós-estímulo

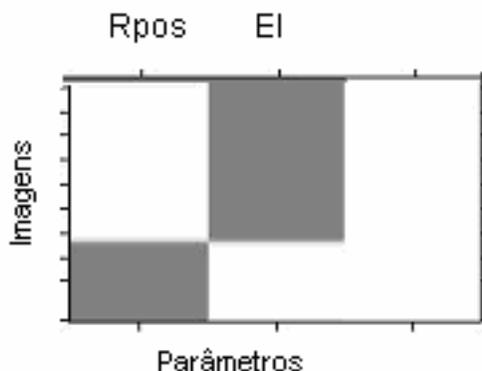


Figura 3.13- Desenho do modelo definido com as condições - Repouso pós-estímulo e Evocação

3.5.2- Análise voxel a voxel e análise de regiões de interesse

A análise *voxelwise* (ou "voxel a voxel") normalmente compreende todo o cérebro. Nesta abordagem, a série temporal de cada voxel da imagem é contrastada com o modelo definido e o cálculo da probabilidade de ativação é realizado com todos os voxels.

Na análise de ROIs, cada região de interesse definida é tratada como se fosse um voxel único. O cálculo realizado para se extrair uma única série temporal que representa as séries de todos os voxels que pertencem a uma região de interesse é chamado de sumarização. Há diferentes cálculos para a sumarização do sinal dentro de uma ROI, como a média aritmética, a mediana e a média ponderada (para *templates* probabilísticos). Neste trabalho, foram feitos testes com o cálculo da média e da mediana, mas optou-se finalmente pela utilização da mediana com o objetivo de diminuir o efeito de ruídos.

Em análises do tipo voxel a voxel a questão básica é: "Quais regiões cerebrais evocam um padrão particular de atividade funcional?" Em análises de ROIs a questão é inversa: "Qual padrão de atividade ocorre em uma região cerebral específica?"

Como discutido no capítulo 2, a análise de ROIs é particularmente útil na exploração de desenhos complexos (também chamados de *factorial designs*), onde há múltiplas condições (Poldrack, 2007 [33]). Esta característica se aplica a este trabalho, pois há várias condições em cada sequência, definidas em um paradigma misto. Outra

motivação proposta por Poldrack para a utilização de ROIs é a redução do número de comparações múltiplas. É o caso deste trabalho, considerando-se que um conjunto limitado de ROIs anatômicas foi selecionado.

Definição de ROIs

Usualmente as ROIs são selecionadas com base em expectativas estabelecidas *a priori* sobre o provável envolvimento de diferentes áreas cerebrais em uma tarefa de acordo com conhecimentos da literatura.

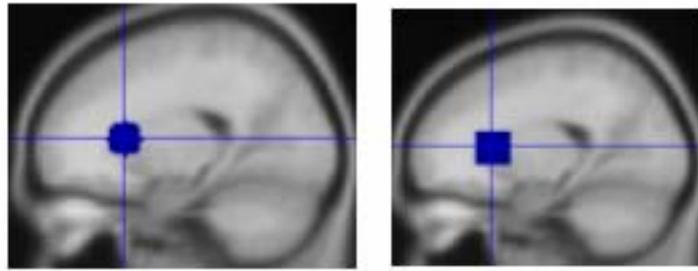
A definição das regiões de interesse em análises de ROIs pode ser realizada de diferentes formas, classificadas em 2 grupos: definição baseada na anatomia e na função.

ROIs funcionais são formadas através de voxels que foram ativados por um estímulo específico. Em um trabalho realizado em 1997 por Kanwisher et al [44] foram obtidos conjuntos de voxels ativados mediante a apresentação de faces em comparação com outros estímulos visuais complexos. Estes voxels foram definidos como uma ROI funcional (*área da face*) e utilizados em estudos subsequentes para avaliar efeitos de outras manipulações experimentais relacionadas a reconhecimento de faces. Estas regiões são chamadas de ROIs funcionais ou *scans localizadores*.

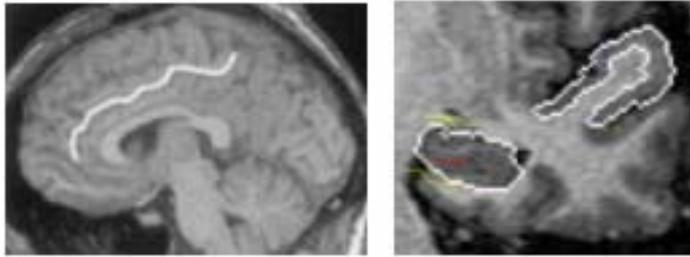
No entanto, a utilização de ROIs funcionais tem sido criticada por alguns autores. Friston et al. (2006) [45] argumentam que a utilização de *scans localizadores* pode ser desnecessária e, em alguns casos, levar a caracterizações enviesadas e inapropriadamente restritas da anatomia funcional.

Assim, em geral as ROIs são demarcadas em imagens estruturais e são baseadas em expectativas *a priori* sobre o provável envolvimento de regiões anatômicas em uma tarefa. As ROIs são então co-registradas com dados funcionais. É comum a definição de ROIs com base na macroanatomia (usualmente baseando-se em padrões gerais).

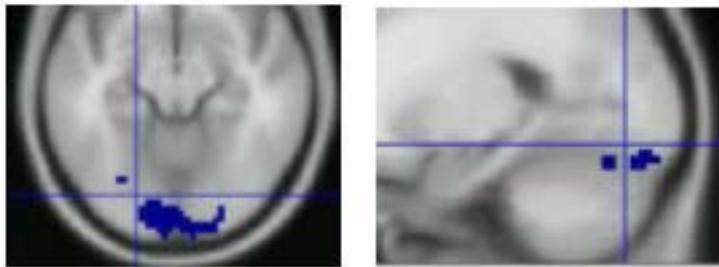
A figura 3.14 ilustra diferentes formas de aquisição de ROIs - baseados em definição de polígonos, delimitação de regiões anatômicas (estruturas e giros), utilização de *templates* e de *clusters* funcionais.



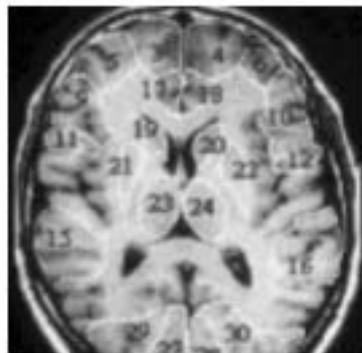
Polígonos



Segmentações baseadas na anatomia



Clusters funcionais



Templates

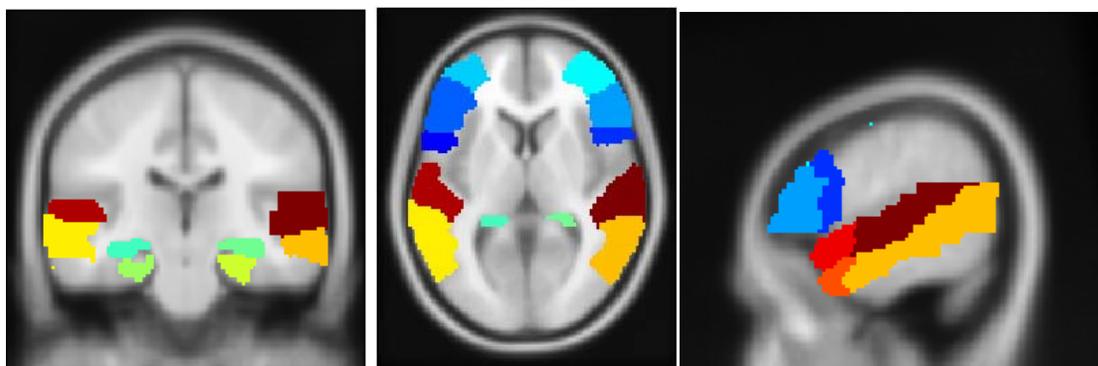
Figura 3.14- Formas de definição de ROIs

Neste trabalho foram utilizadas ROIs obtidas a partir de uma biblioteca fornecida por Tzourio-Mazoyer et al. (2002) [30]. Esta biblioteca é composta por 116 regiões anatômicas rotuladas resultantes da segmentação manual de um único indivíduo normalizado em relação a uma imagem T1 de alta resolução provida pelo MNI (Montreal Neurological Institute). Esta imagem (normalizada pela média de volumes cerebrais de 152 indivíduos) é descrita em Collins et al. (1998) [46].

A partir desta biblioteca, foram selecionadas inicialmente como regiões de interesse para o estudo 3 regiões frontais e 7 temporais que, de acordo com a literatura, parecem estar envolvidas com o processo de memorização e que podem ser afetadas em consequência da patologia estudada. Buckner (2003) [47] e Addis e McAndrews (2006)[48] discutem sobre o provável envolvimento de determinadas estruturas anatômicas em processos de memorização. As regiões inicialmente selecionadas foram:

- Giro frontal inferior - *pars opercularis*
- Giro frontal inferior - *pars triangularis*
- Giro frontal médio
- Amígdala
- Hipocampo
- Giro parahipocampal
- Giro temporal médio
- Região polar temporal média
- Região polar superior
- Giro temporal superior

Todas as estruturas foram selecionadas bilateralmente, resultando em 20 regiões. A figura 3.15 mostra as regiões inicialmente selecionadas.



(a) Coronal

(b) Axial

(c) Sagittal

Figura 3.15- ROIs originais

Segundo Huettel et al. (2004) [1], "ROIs são consideradas como unidades homogêneas e indivisíveis (ao menos para propostas de análises de ROIs)". No entanto, segundo os autores, se somente uma pequena subdivisão de uma ROI anatômica é ativada pela tarefa considerada, então a relação sinal-ruído funcional pode ser reduzida pela inclusão de muitos voxels inativos. Neste caso, pode ser benéfico subdividir a ROI anatômica.

Segundo Poldrack (2007) [33], a decisão sobre a abordagem utilizada na medição de sinal dentro de uma ROI é uma questão difícil. As regiões definidas podem ser relativamente grandes (como, no caso deste trabalho, o giro temporal superior, por exemplo). Ainda, mesmo que a região seja significativamente ativa, esta ativação pode ocorrer em uma pequena proporção de voxels dentro da ROI. Por esta razão, a realização da média pode cancelar a ativação, devido ao ruído das regiões não ativadas.

Através da observação das ROIs selecionadas originalmente, assim como da observação de resultados de análises preliminares, percebeu-se que havia uma diferença muito acentuada entre os tamanhos das regiões consideradas, o que poderia influenciar os resultados devido à heterogeneidade funcional das regiões. Assim, optou-se por subdividir as ROIs com volume maior que 10000 mm³. O hipocampo, apesar de ter um volume menor (cerca de 7500 mm³) foi subdividido por ser uma estrutura alongada.

- Os giros frontal inferior triangular, frontal médio, temporal medial e temporal superior e o hipocampo foram divididos nas porções anterior e posterior. O giro têmporo-polar superior foi subdividido nas porções lateral e medial. Desta forma, 16 regiões definidas bilateralmente foram utilizadas. As ROIs resultantes da subdivisão são mostradas na figura 3.16..

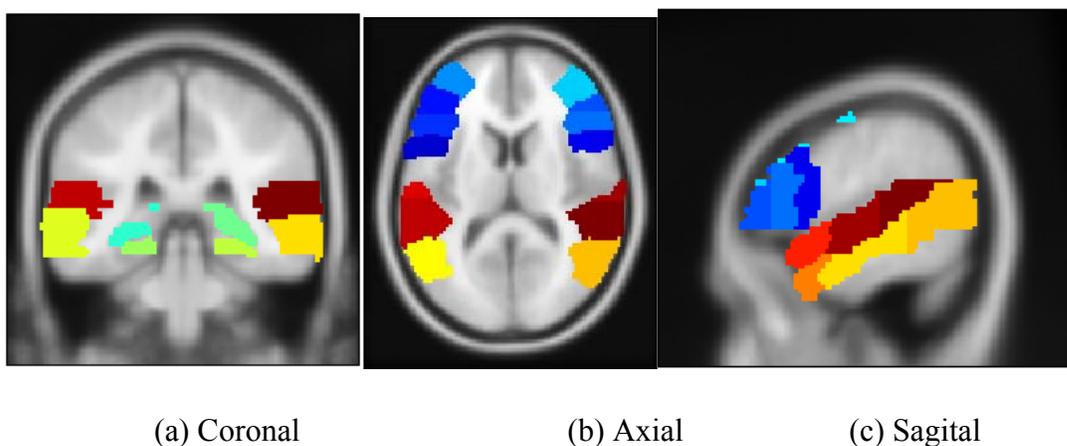


Figura 3.16- ROIs subdivididas

A subdivisão foi realizada através da intersecção das estruturas com cubos delimitando suas dimensões. Assim, as seguintes subdivisões foram feitas:

Outra abordagem possível para a análise por ROIs é a limiarização do mapa estatístico seguida pela contagem do número de voxels ativado dentro de cada região. No entanto, esta abordagem pode ser muito sensível ao limiar escolhido. Ainda, a contagem de voxels não é uma medida tão confiável de ativação comparada a medidas diretas de alterações do sinal (como argumentado por Cohen e Dubois em 1999 [49]). Esta abordagem também parte da suposição de que as regiões especificadas são funcionalmente homogêneas. No entanto, se existirem áreas de ativação e desativação dentro de uma mesma região, estas podem se cancelar entre si.

Outra alternativa de utilização de ROIs na análise fMRI é a restrição da análise voxel a voxel a um conjunto de ROIs de forma que o controle para múltiplas comparações seja realizado somente nos voxels que pertençam às ROIs. Esta abordagem não apresenta

os problemas relacionados à sumarização de ROIs, mas também não fornece o mesmo nível de *insight* sobre os padrões de ativação como as medidas envolvendo a quantificação entre condições.

3.5.3- Análise de Grupo

Através do *software* SPM2 é possível realizar a análise de um grupo de indivíduos para a obtenção de ativações que representam o grupo.

Esta análise é realizada através da concatenação das séries temporais provenientes de diferentes indivíduos, como ilustrado na figura 3.17.

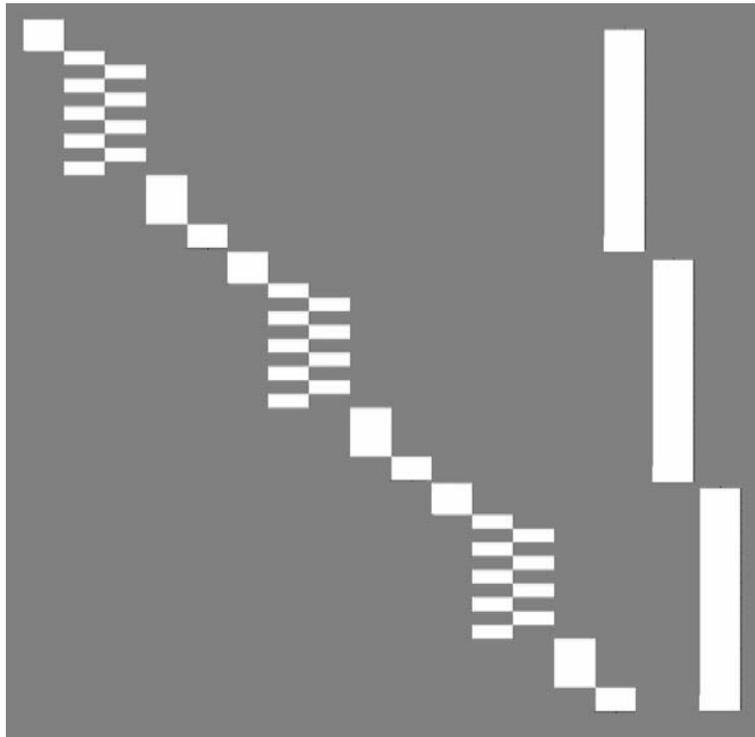


Figura 3.17- Representação da concatenação de séries temporais de 3 indivíduos

Esta forma de análise de grupo faz com que as séries de diferentes indivíduos sejam encadeadas como repetições de blocos de um mesmo indivíduo.

Neste trabalho de doutorado foi desenvolvido e testado um novo método de análise de grupo baseado no cálculo da média das imagens de todos os indivíduos de um grupo, em cada instante de tempo.

A motivação para o desenvolvimento desta nova abordagem se baseou nos seguintes fatores:

- 1) Uma hipótese levantada pelo grupo de pesquisa é de que a média das imagens funcionais dos indivíduos poderia refletir melhor a ativação a ser estudada no grupo populacional, pois reduziria o efeito de diferenças individuais;
- 2) A análise por concatenação das séries temporais apresenta um custo computacional muito alto. O desenvolvimento desta nova abordagem reduziria de forma muito significativa o tempo de computação da análise de grupo.

Com este objetivo foi desenvolvido um programa para efetuar a média das imagens de cada indivíduo, através do algoritmo descrito na figura 3.18.

```
Para cada instante de tempo  $t$ 
{
  Para cada indivíduo  $i$ 
  {
    Leitura da imagem 3D  $img(t,i)$ ;
    Acúmulo das intensidades de todos os voxels de  $img(t,i)$  em uma imagem 3D;
  }
  Cálculo da média das imagens 3D acumuladas no instante  $t$ ;
  Gravação da imagem média no instante  $t$ ;
}
```

Figura 3.18- Algoritmo para cálculo da média das imagens 4D de um grupo populacional

Este algoritmo foi implementado utilizando-se a linguagem de programação MatLab ⁷.

O cálculo da média é efetuado após o pré-processamento das imagens. A análise é então realizada na imagem média resultante da mesma forma como seria executada a análise de um único indivíduo.

⁷<http://www.mathworks.com/>

4- RESULTADOS

Este capítulo é formado por duas partes. Na seção 4.1 são apresentados resultados comparativos entre a análise de grupo realizada de forma concatenada e a análise da média dos indivíduos. As duas abordagens foram realizadas utilizando-se o grupo de controles. Na seção 4.2 são apresentados resultados da análise de regiões de interesse dos grupos de pacientes (utilizando a análise pela média).

4.1- Comparação das técnicas de análise de grupo (média X concatenada) em controles

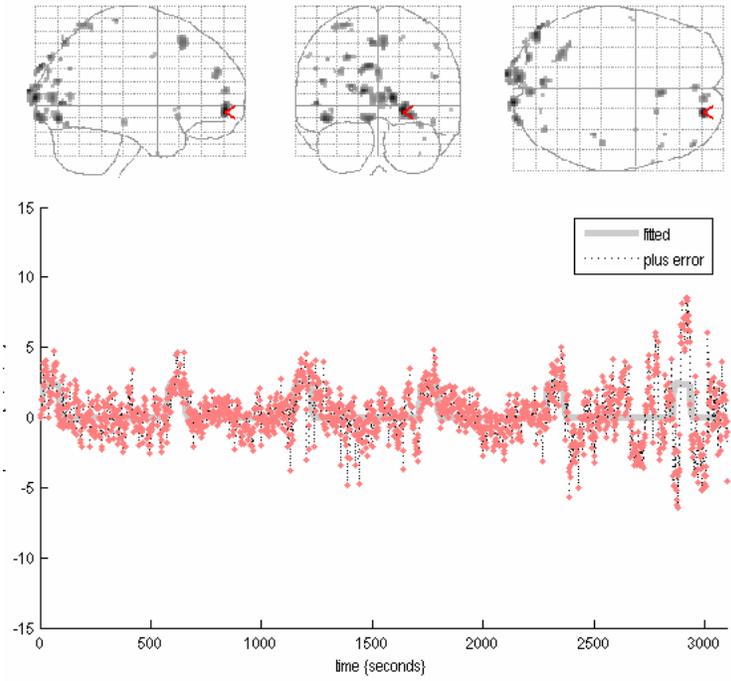
As figuras a seguir ilustram a comparação dos resultados da análise realizada de forma concatenada e pela média do grupo de controles. Na seção 4.1.1 são mostrados resultados da comparação através da análise voxel a voxel e na seção 4.1 são apresentados resultados da análise de regiões de interesse.

4.1.1- Análise voxel a voxel

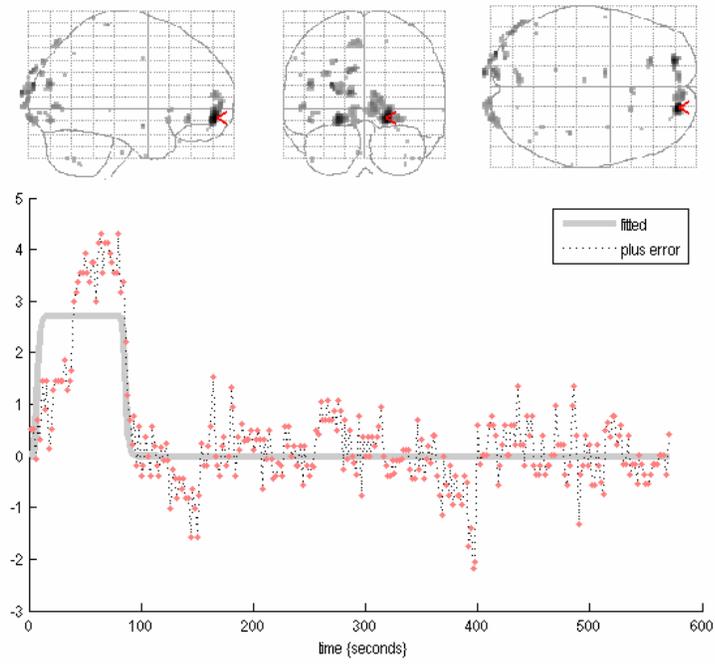
Os resultados são mostrados para as 5 condições da sequência 1 (codificação e evocação imediata na memória verbal). As 5 condições que fazem parte da sequência foram incluídas no mes'00imo desenho, utilizando-se os seguintes contrastes:

- Repouso pré-estímulo (Rpre): 1 0 0 0 0
- Não-palavra (NP): 0 1 0 0 0
- Palavra (P): 0 0 1 0 0
- Repouso pós-estímulo (Rpos): 0 0 0 1 0
- Evocação imediata (EI): 0 0 0 0 1

As figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 mostram os resultados da análise voxel a voxel, cuja ativação foi obtida realçando-se respectivamente: Rpre, NP, P, Rpos e EI. Em cada figura são mostrados os resultados da análise concatenada (A) e da análise da média (B).

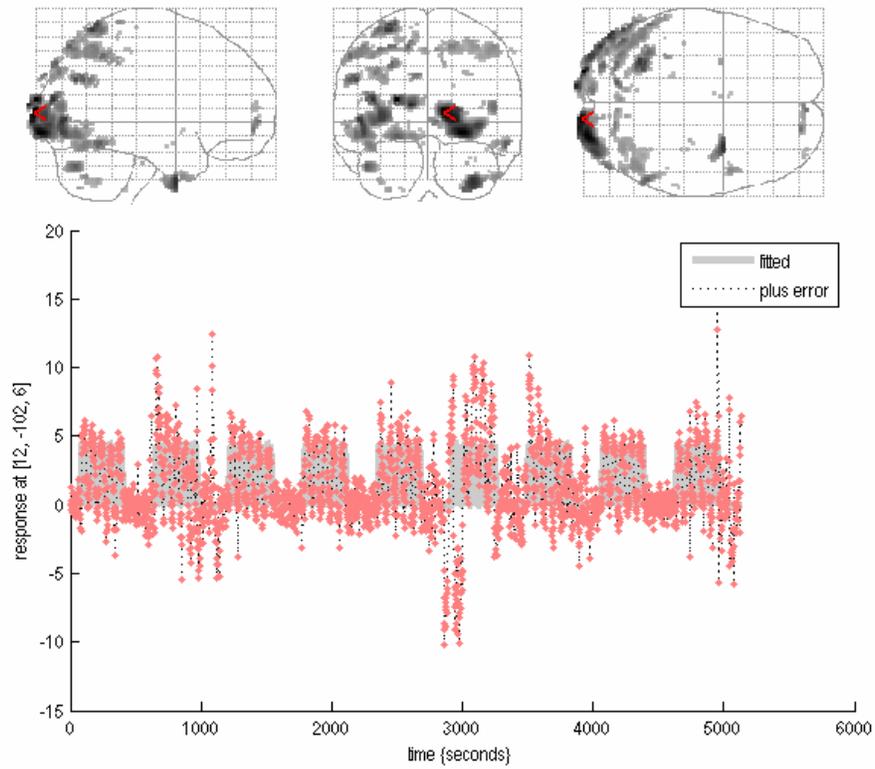


(a) Concatenada

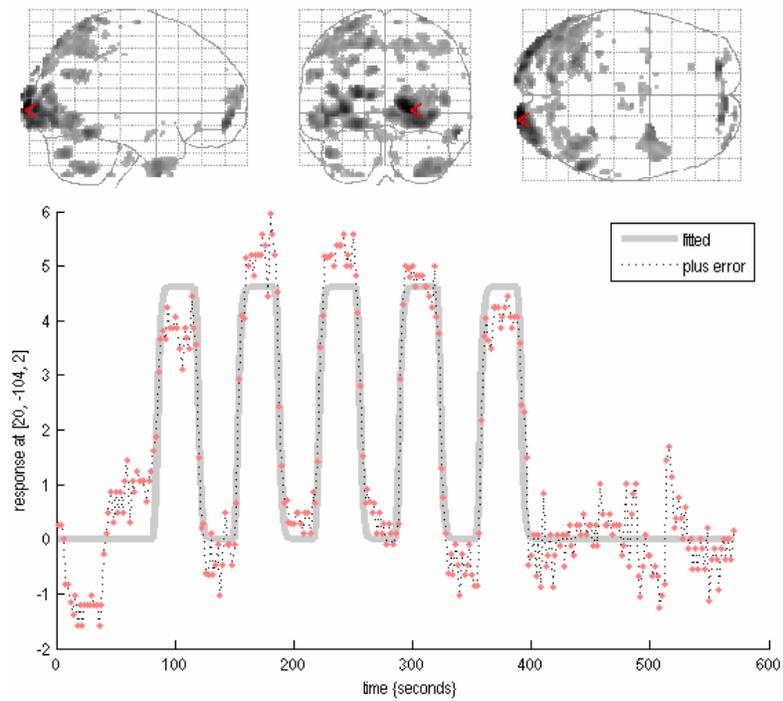


(b) Media

Figura 4.1- Comparação de abordagens de análise de grupo - Repouso pré-estímulo

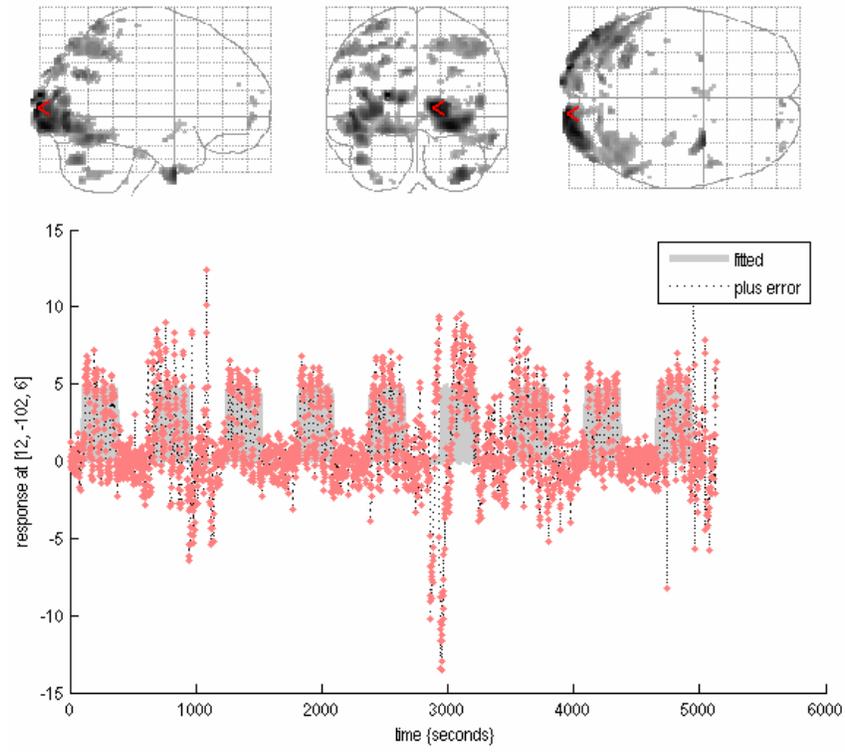


(a) Concatenada

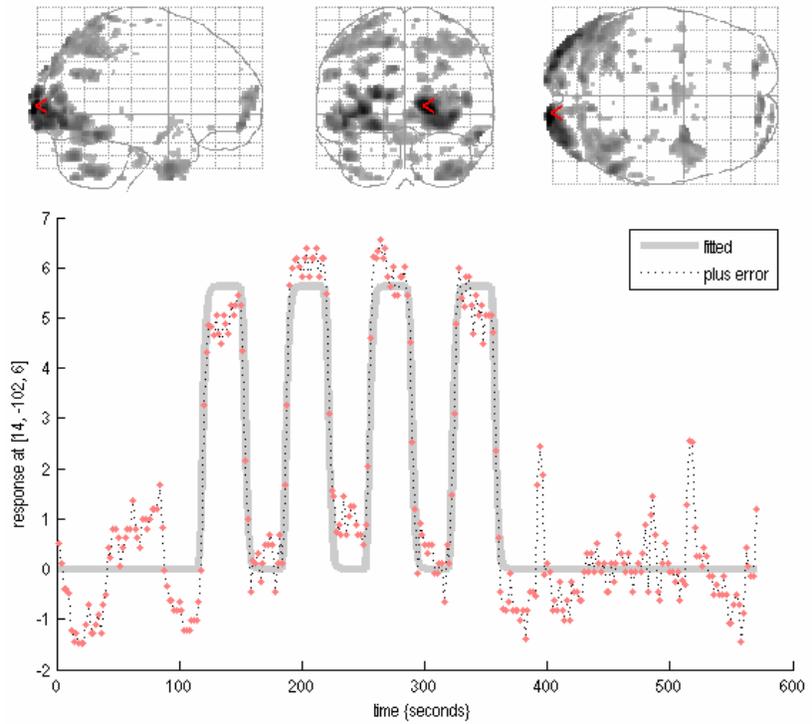


(b) Media

Figura 4.2- Comparação de abordagens de análise de grupo - Não-palavra

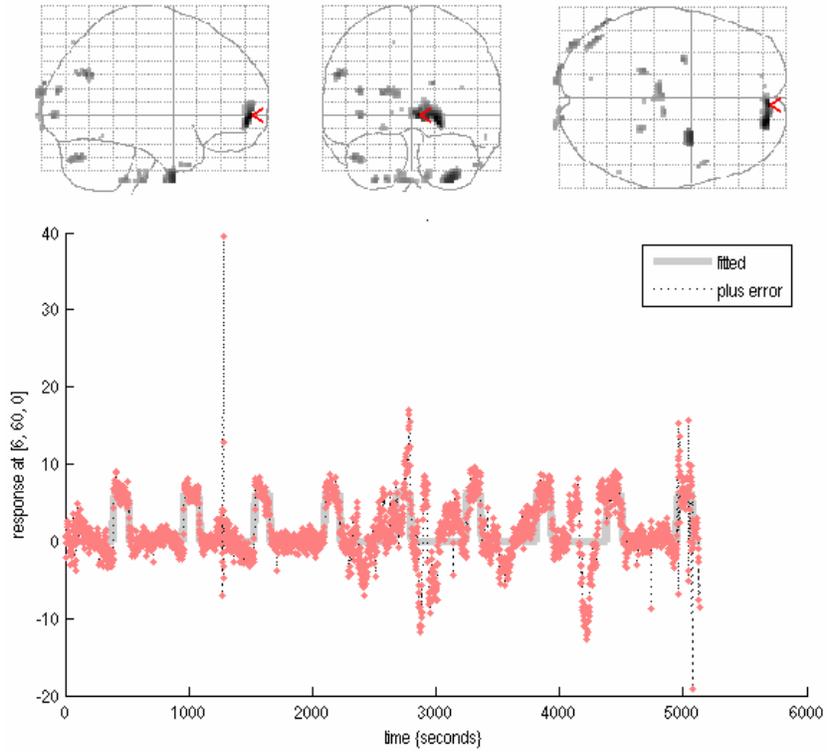


(a) Concatenada

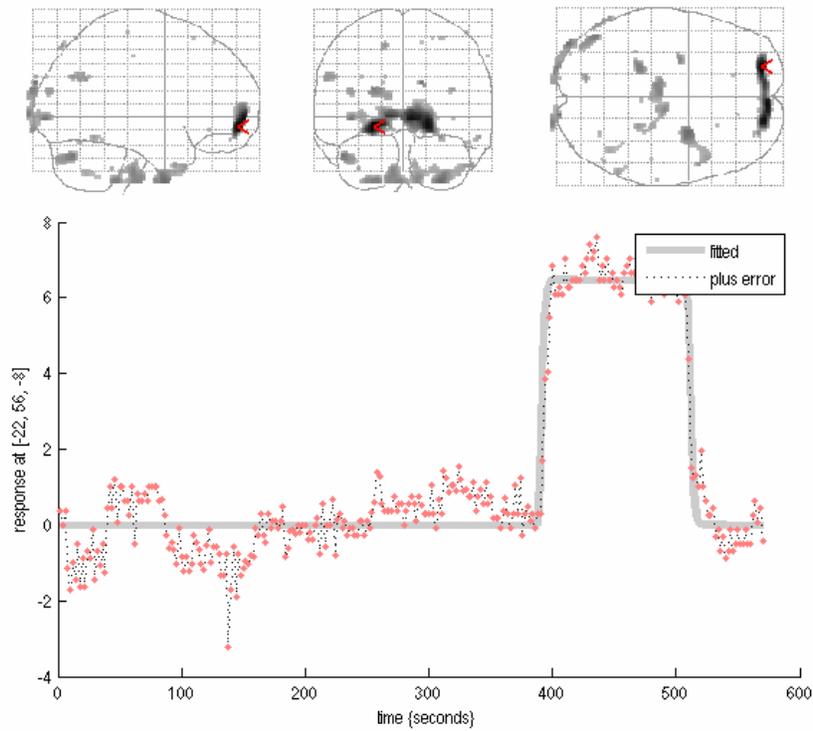


(b) Média

Figura 4.3- Comparação de abordagens de análise de grupo - Palavras

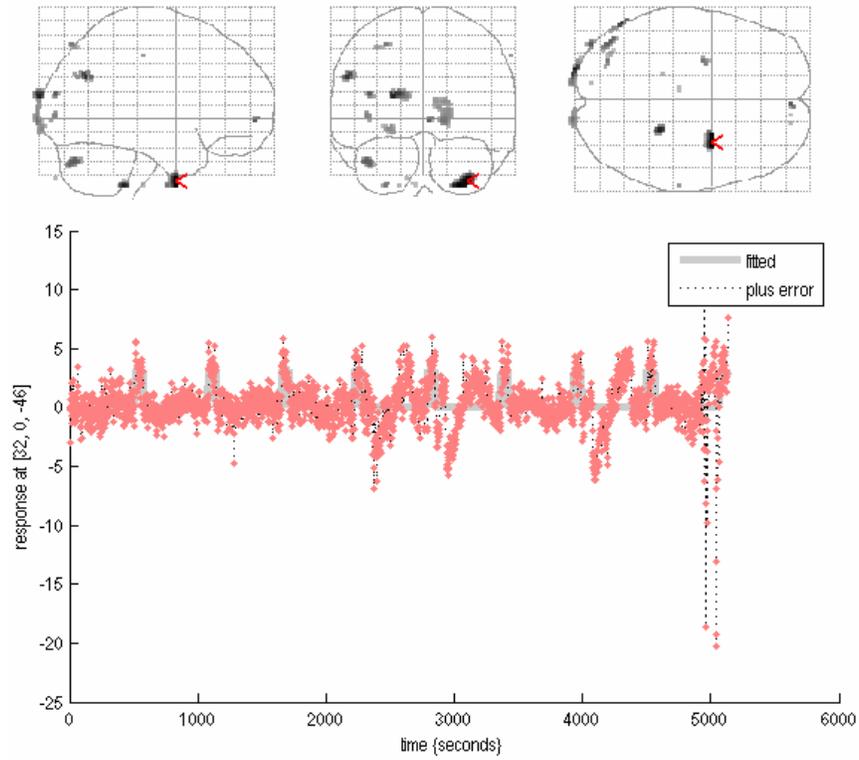


(a) Concatenada

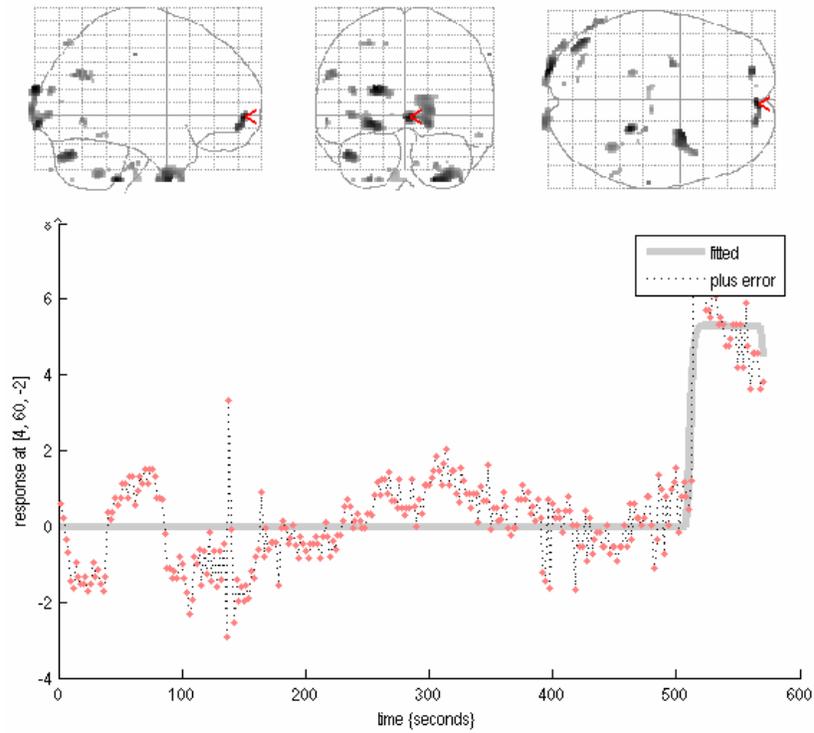


(b) Media

Figura 4.4- Comparação de abordagens de análise de grupo - Repouso pós-estímulo



(a) Concatenada



(b) Média

Figura 4.5- Comparação de abordagens de análise de grupo - Evocação imediata

4.1.2- Análise de regiões de interesse

A seguir são mostrados resultados da análise de ROIs realizada com o grupo de controles utilizando as duas abordagens de análise de grupo: concatenada e média. Os resultados são apresentados através de tabelas que mostram a probabilidade de ativação de cada uma das regiões consideradas (descritas na seção e mostradas na figura 4.6). Em todas as tabelas resultantes de análises de ROIs apresentadas, os valores correspondentes a $p < 0.001$ estão realçados na cor vermelha e os valores correspondentes a $0.001 < p < 0.01$ estão realçados na cor amarela.

ROIs anatômicos	Rpré	Não-pal	Palavra	Rpós	Evocação
Amígdala esquerda	0.94061	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Amígdala direita	0.66758	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars opercularis</i>	0.58841	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars opercularis</i>	0.31283	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.89638	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.54727	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.27593	0.98745	0.99601	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.55753	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção anterior	0.33016	0.99999	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção posterior	0.84094	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção anterior	0.29815	0.99999	1.00000	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção posterior	0.33222	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção anterior	0.97646	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção posterior	0.96849	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção anterior	0.70448	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção posterior	0.92529	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal esquerdo	0.69949	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal direito	0.55967	0.99997	0.99997	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção anterior	0.56110	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção posterior	0.73994	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção anterior	0.04549	0.99404	0.99582	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção posterior	0.48061	0.99997	0.99989	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio esquerdo	0.72904	0.42229	0.33953	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio direito	0.00293	0.00000	0.00000	0.10812	0.00018
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção lateral	0.82566	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção medial	0.90495	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção lateral	0.23737	0.99716	0.99740	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção medial	0.45131	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção anterior	0.49612	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção posterior	0.70845	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção anterior	0.09174	0.99887	0.99996	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção posterior	0.83385	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000

Figura 4.6- Análise de ROIs concatenada

ROIs anatômicos	Rpré	Não-pal	Palavra	Rpós	Evocação
Amígdala esquerda	0.88130	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Amígdala direita	0.64542	0.99997	0.99999	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars opercularis</i>	0.54695	0.99756	0.99896	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars opercularis</i>	0.37370	0.99671	0.99714	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.79073	0.99983	0.99991	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.57152	0.99902	0.99955	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.34115	0.97092	0.99222	0.99997	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.47872	0.99473	0.99576	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção anterior	0.40227	0.99828	0.99934	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção posterior	0.55186	0.99991	0.99997	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção anterior	0.49246	0.99678	0.99876	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção posterior	0.50068	0.99923	0.99963	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção anterior	0.73732	0.99999	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção posterior	0.85343	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção anterior	0.45358	0.99904	0.99938	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção posterior	0.78316	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal esquerdo	0.72105	0.99953	0.99989	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal direito	0.75138	0.99966	0.99929	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção anterior	0.51049	0.99964	0.99961	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção posterior	0.72030	0.99954	0.99930	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção anterior	0.06987	0.97884	0.98450	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção posterior	0.53124	0.99966	0.99911	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio esquerdo	0.84006	0.83817	0.83720	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio direito	0.00320	0.00001	0.00000	0.93797	0.04131
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção lateral	0.53414	0.99050	0.99270	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção medial	0.68750	0.99999	0.99998	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção lateral	0.60453	0.99251	0.99576	0.99995	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção medial	0.58756	0.99997	0.99998	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção anterior	0.46316	0.99854	0.99969	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção posterior	0.55419	0.99886	0.99946	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção anterior	0.18916	0.97122	0.99301	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção posterior	0.64818	0.99928	0.99979	1.00000	1.00000

Figura 4.7- Análise de ROIs pela média

4.2- Comparações entre grupos

Nesta seção são apresentados resultados de análises de regiões de interesse realizadas com os grupos de pacientes ELTM com atrofia hipocampal esquerda (AHE - figura 4.8) e com atrofia hipocampal direita (AHD - figura 4.9). Estas tabelas podem ser comparadas com a tabela da figura 4.7, que mostra a análise de regiões de interesse realizada com o grupo controle.

ROIs anatômicos	Rpré	Não-pal	Palavra	Rpós	Evocação
Amígdala esquerda	0.56014	0.99955	0.99832	1.00000	1.00000
Amígdala direita	0.38062	0.89574	0.86320	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars opercularis</i>	0.57605	0.99981	0.99880	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars opercularis</i>	0.70514	0.99991	0.99812	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.72621	0.99997	0.99983	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.73312	0.99990	0.99799	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.88130	0.89576	0.74827	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.88988	0.99986	0.99804	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção anterior	0.90745	0.99999	0.99996	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção posterior	0.80118	0.99999	0.99999	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção anterior	0.72931	0.99587	0.97369	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção posterior	0.89737	1.00000	0.99998	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção anterior	0.76961	0.99962	0.99739	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção posterior	0.61748	0.99997	0.99995	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção anterior	0.82322	0.99998	0.99989	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção posterior	0.45523	0.99980	0.99951	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal esquerdo	0.99341	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal direito	0.99995	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção anterior	0.88551	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção posterior	0.59168	0.99988	0.99851	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção anterior	0.80098	0.99969	0.99949	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção posterior	0.77201	0.99988	0.99904	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio esquerdo	0.98036	0.98937	0.98941	0.99761	1.00000
Giro têmporo-polar médio direito	0.61513	0.00006	0.00002	0.00000	0.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção lateral	0.99128	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção medial	0.99277	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção lateral	0.82978	0.99886	0.99612	1.00000	0.99997
Giro têmporo-polar superior direito - porção medial	0.94161	0.97115	0.95844	0.99863	0.99999
Giro temporal superior esquerdo - porção anterior	0.52553	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção posterior	0.64334	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção anterior	0.16092	0.99305	0.99147	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção posterior	0.60036	1.00000	0.99996	1.00000	1.00000

Figura 4.8- Análise de ROIs do grupo de pacientes com atrofia hipocampal esquerda (AHE) - série de codificação verbal - condições: repouso pré-estímulo, não-palavra, palavras, repouso pós-estímulo, evocação imediata

ROIs anatômicos	Rpré	Não-pal	Palavra	Rpós	Evocação
Amígdala esquerda	0.82170	0.99995	0.99998	1.00000	1.00000
Amígdala direita	0.63322	0.99770	0.99846	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars opercularis</i>	0.82135	0.99599	0.98513	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars opercularis</i>	0.71312	0.99543	0.98388	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.94513	0.99983	0.99948	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior esquerdo - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.81489	0.99461	0.97908	1.00000	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção anterior	0.45720	0.15625	0.14658	0.99867	1.00000
Giro frontal inferior direito - <i>pars triangularis</i> - porção posterior	0.69517	0.97561	0.95360	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção anterior	0.87306	0.99719	0.99375	1.00000	1.00000
Giro frontal médio esquerdo - porção posterior	0.86386	0.99795	0.99710	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção anterior	0.76651	0.96654	0.95611	1.00000	1.00000
Giro frontal médio direito - porção posterior	0.85943	0.99488	0.98897	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção anterior	0.86477	0.99997	0.99995	1.00000	1.00000
Hipocampo esquerdo - porção posterior	0.81364	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção anterior	0.56203	0.99182	0.98699	1.00000	1.00000
Hipocampo direito - porção posterior	0.65700	0.99998	0.99996	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal esquerdo	0.78262	0.99842	0.99877	1.00000	1.00000
Giro parahipocampal direito	0.92433	0.99999	1.00000	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção anterior	0.54127	0.99964	0.99965	1.00000	1.00000
Giro temporal médio esquerdo - porção posterior	0.84909	0.99998	0.99935	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção anterior	0.53807	0.97857	0.95127	1.00000	1.00000
Giro temporal médio direito - porção posterior	0.69675	0.99998	0.99991	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar médio esquerdo	0.94675	0.99822	0.99988	0.00734	0.11339
Giro têmporo-polar médio direito	0.20329	0.05087	0.18586	0.00000	0.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção lateral	0.78522	0.99945	0.99817	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior esquerdo - porção medial	0.89655	0.99990	0.99988	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção lateral	0.39061	0.55125	0.13833	1.00000	1.00000
Giro têmporo-polar superior direito - porção medial	0.46324	0.97144	0.91220	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção anterior	0.43475	0.99994	0.99989	1.00000	1.00000
Giro temporal superior esquerdo - porção posterior	0.72252	0.99960	0.99903	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção anterior	0.34322	0.98998	0.98941	1.00000	1.00000
Giro temporal superior direito - porção posterior	0.74405	0.99971	0.99915	1.00000	1.00000

Figura 4.9- Análise de ROIs do grupo de pacientes com atrofia hipocampal direita (AHD) - série de codificação verbal - condições: repouso pré-estímulo, não-palavra, palavras, repouso pós-estímulo, evocação imediata

5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em todo o processo de preparação dos dados, pré-processamento e análise, foram realizados testes comparativos de diferentes abordagens utilizando imagens de controles. Algumas das observações sobre os processos comparativos são discutidas nas seções 5.1, 5.2 e 5.3. Na seção 5.4 são discutidas questões relacionadas à análise de ROI baseada na utilização de *templates*. Na seção 5.5 são discutidas formas de manipulação de contrastes utilizadas na análise. Na seção 5.6 são discutidas diferenças encontradas na análise de regiões de interesse entre os grupos populacionais considerados (controles, pacientes AHE e pacientes AHD).

5.1- Pré-processamento individual e pré-processamento em grupo

Em relação ao pré-processamento foram feitas comparações entre as análises de grupo realizadas a partir de imagens pré-processadas individualmente e imagens pré-processadas em grupo (ambos recursos disponíveis no *software* SPM2). Não foram encontradas alterações significativas entre as duas abordagens, tanto na análise voxel a voxel quanto na análise de regiões de interesse.

5.2- Utilização de suavização na análise de ROIs

A questão da utilização de suavização no pré-processamento das imagens para análise de regiões de interesse foi abordada. Segundo Huettel et al. (2004) [1], a suavização é benéfica para análises voxel a voxel mas tem pouco efeito em análises de regiões de interesse. Em abordagens de ROIs, por definição, constrói-se regiões funcionais limitadas para análises subseqüentes. As arestas destas regiões são consideradas significativas, de forma que a difusão dos níveis de cinza pode introduzir variabilidade indesejada na análise. Neste trabalho foram feitos testes de análises de regiões de interesse a partir de imagens suavizadas e não suavizadas. Os resultados mostraram uma diferença pequena, mas optou-se pelas imagens suavizadas por se tratar de análise de grupo, pois o processo de suavização pode reduzir diferenças individuais.

5.3- Análise de grupo concatenada e análise pela média do grupo

Em relação à análise de grupo, a partir da comparação entre a abordagem de concatenação das séries de diferentes indivíduos e a análise realizada a partir da média, foi possível observar:

- As localizações das ativações são semelhantes nas duas abordagens, mas as áreas ativadas são ligeiramente mais extensas na análise pela média que na análise concatenada;
- A amplitude da resposta é praticamente a mesma entre as duas abordagens;
- O erro de ajuste ao modelo é ligeiramente menor na análise da média em relação à análise concatenada;
- Em relação ao ponto de máxima ativação, há diferenças de localização entre as duas abordagens. No entanto, estas diferenças parecem ser maiores nas análises que apresentaram *outliers* nas séries temporais de algum indivíduo (que aparecem de forma mais evidente nas figuras 4.4 e 4.5). É possível que a implementação da mediana diminua este efeito.

Assim, a utilização da análise de grupo realizada a partir da média das imagens dos indivíduos parece promissora, pois ressalta as características comuns e aumenta a relação sinal/ruído. As diferenças de localização do ponto de máxima ativação (embora pequenas nas análises de algumas condições) mostram que testes adicionais devem ser realizados quanto à sua exatidão. Uma importante vantagem desta abordagem é a redução do custo computacional, que é uma questão crítica na análise realizada com grupos de indivíduos.

5.4- Análise de ROIs através de *templates*

Quanto à análise de regiões de interesse, a abordagem de utilização de *templates* pré-definidos e sumarização das séries temporais dentro das regiões consideradas parece ser bastante útil na exploração dos dados e comparação entre condições em análises de grupos. Segundo Poldrack (2007) [33], ainda não há uma comparação sistemática do poder de redução de erros do tipo falso-positivo na abordagem de análise de ROI (devido à

redução no número de comparações múltiplas) em comparação a métodos de correção utilizados em análises voxel a voxel (como a teoria do campo randômico gaussiano, testes de randomização ou correções de taxa de falsa descoberta). Segundo o autor, a utilização de análise de ROI com finalidade exploratória deveria ser uma prática padrão na maioria dos estudos, pois pode fornecer informações substanciais sobre a natureza dos sinais de ativação. No entanto, seu valor inferencial está limitado pela escolha das ROIs.

5.5- Comparação entre contrastes

Na definição dos contrastes, a abordagem utilizada nos resultados apresentados no capítulo 4 consistiu em incluir todas as condições de uma sequência em um mesmo desenho e contrastar cada condição (ponderada com o valor 1) contra as demais (ponderadas com o valor 0). No entanto, outras alternativas foram testadas. Uma abordagem consistiu em contrastar individualmente as condições Não-palavra, Palavras e Evocação Imediata com o repouso pré-estímulo, ponderando este último com o valor -1, a condição contrastada com o valor 1 e as demais condições com o valor zero. No entanto, para a interpretação dos resultados obtidos serão necessários testes adicionais. Outra abordagem consistiu em separar-se manualmente os *scans* correspondentes às condições que se deseja contrastar. Esta abordagem apresenta limitações, pois depende da separação de instantes de tempo não-contíguos (como por exemplo, as condições Repouso pré-estímulo e Evocação), o que não parece ser o ideal no contexto da análise do sinal BOLD. No entanto, esta abordagem possibilitou verificar que há diferença significativa entre o contraste do repouso pós-estímulo em relação ao repouso pré-estímulo (parecendo indicar que o repouso pós-estímulo não pode ser considerado como condição basal).

5.6- Diferenças encontradas entre os grupos

Em relação ao estudo da epilepsia através da utilização de imagens funcionais por ressonância magnética, as análises realizadas até o momento mostraram diferenças significativas no padrão de ativação entre os grupos de controles, pacientes ELTM com atrofia hipocampal direita e pacientes ELTM com atrofia hipocampal esquerda, independente das diferentes abordagens de análise consideradas.

6- SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Estudos adicionais para a continuidade do trabalho devem ser realizados em questões relacionadas à análise de grupo, efeitos de utilização de contrastes e aperfeiçoamento do paradigma. O desenvolvimento de estudos dirigidos a parâmetros de aquisição, técnicas de alinhamento e aspectos relacionados à organização do projeto experimental podem ajudar a aperfeiçoar a qualidade dos dados e contribuir para a obtenção de melhores resultados.

Um dos desafios da utilização do \tilde{ttest} para desenho em blocos consiste em decidir quais pontos de tempo pertencem a quais condições experimentais. Como a resposta BOLD apresenta um retardo em relação à atividade neuronal (latência hemodinâmica), uma abordagem para contornar este problema seria adicionar um atraso no *onset* de todos os blocos. Mas, como as mudanças no sinal BOLD não são instantâneas ainda haveria períodos de transição no *onset* de cada bloco onde o sinal estaria mudando de baixo para alto (e vice-versa). Pela exclusão destes períodos transientes e amostragem somente nas partes posteriores de cada bloco, pode-se selecionar instantes de tempo onde a resposta BOLD tenha alcançado um estado estável, maximizando o poder do \tilde{ttest} .

Em relação à análise de regiões de interesse, uma sugestão é a realização da mesma abordagem deste trabalho (através da sumarização das séries temporais que compõem uma estrutura anatômica) mas utilizando como *template* um atlas anatômico definido de forma probabilística (como os propostos por Hammers et al., 2003 [50], Shattuck et al., 2006 [51] ou Eickhoff et al., 2006 [52], baseado nas áreas de Brodmann). A utilização de um *template* pré-definido baseado na anatomia de um único indivíduo, mesmo normalizado para um grupo que representa uma extensa amostra populacional (como o *átlas* utilizado - AAL [30]) resulta em problemas de sobreposição para grupos de indivíduos, como argumenta Nieto-Castanon et al. (2003) [53]. A realização de análises baseadas em segmentações individuais a partir de imagens estruturais também pode ser uma abordagem interessante para se buscar alterações específicas. No entanto, como neste trabalho optou-se pela realização da análise de grupo, a utilização de um *template* tornou-se necessária. A comparação da diferença entre análises baseadas em segmentações individuais e em *templates* pode fornecer dados adicionais sobre a confiabilidade do método utilizado.

Na análise de ROIs, além da informação fornecida por tabelas estatísticas da probabilidade de ativação em cada região, outras medições podem ser realizadas, como a análise da distribuição espacial de ativação dentro da ROI considerada. Huettel et al (2004) menciona alguns tipos de análises possíveis. MacKeown e Hanlon (2004) [54] propõem um método para combinar estatísticas baseadas em voxel dentro de ROIs definidas anatomicamente entre indivíduos. Bogorodzki et al. (2005) [55] propõem uma técnica de classificação multigrupo baseada em diferenças súbitas na atividade cerebral regional em um paradigma fMRI complexo utilizando regiões de interesse.

Ainda, outras abordagens podem ser consideradas na análise relacionada a regiões que apresentam maior dificuldade na detecção de ativação (como nas estruturas do lobo temporal). Chen et al. (2006) [56] propõem um método de análise de *cluster* hierárquico integrada a correlação de vizinhança, demonstrando sua utilização na aplicação de estímulos visuais. Os autores sugerem que o método proposto pode ser utilizado na detecção de sinal fMRI fraco. Lu et al (2003) [57] e Lu et al. (2004) [58] propõem a utilização de métodos de crescimento de regiões (utilizado em segmentação de imagens) para aplicação em detecção de ativação. Zang et al. (2004) [59] propõem um algoritmo de homogeneidade funcional para a análise de dados fMRI.

O trabalho realizado deve também fornecer base para estudos de conectividade funcional e anatômica e sistemas funcionais complexos. Koch et al. (2002) [60] e Ramnani et al. (2004) [61] propõem o estudo da conectividade funcional e anatômica utilizando imagens fMRI e imagens de difusão. Guye et al (2003) [62] também propõem a combinação de fMRI e imagens de difusão e demonstram sua técnica através do estudo de conectividade do córtex motor primário. Beckman e Smith (2005) propõem a utilização de extensões tensoriais da técnica ICA (*Independent Component Analysis*) para análise fMRI de grupo. Menon et al. (2000) [63] propõem o estudo de redes distribuídas no processamento de memória através de sistemas neurais baseados em ROIs. Estudos de conectividade funcional, anatômica e efetiva podem ser realizados com os dados considerados. Kim et al. (2007) [64] propõem um método de modelagem de equação estrutural unificado para a análise de grupo de forma multivariada em dados fMRI.

Em análises preliminares realizadas neste trabalho utilizando a combinação de todas as condições do desenho foram encontrados resultados que parecem sugerir a existência de desativações em algumas regiões mediante a aplicação de determinados estímulos em relação ao repouso. Estas observações, aliadas a descrições recentes da literatura (Tomasi et al., 2006 [65], Damoiseaus et al., 2006 [66], Greicius et al., 2004 [67], Van de Ven et al., 2004 [68], Minati et al., 2007 [69], Salvador et al., 2005 [70], Gusnard e Raichle, 2001 [71], Fransson, 2005 [72]) motivam a investigações sobre *resting-state*. Este tipo de estudo aplicado a epilepsia parece ser promissor.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Huettel SA, Song AW, and McCarthy G. *Functional Magnetic Resonance Imaging*. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sinauer Associates, Inc., 23 Plumtree Road, Sunderland, MA. 01375 U.S.A., first edition, 2004.
- [2] Purves D, Fitzpatrick D, Augustine GJ, and Katz LC. *Neuroscience*. 2 edition, 2001.
- [3] Araújo DB. *Sobre Neuroimagens Funcionais por Magnetoencefalografia e Ressonância Magnética: Novos Métodos e Aplicações*. PhD thesis, USP, Universidade do Estado de São Paulo, 2002.
- [4] Gökçay D, Mohr CM, Crosson B, Leonard CM, and Bobholz JA. LOFA: Software for individualized localization of functional MRI activity. *NeuroImage*, 10(6):749–755, 1999.
- [5] Thulborn KR, Waterton JC, and Matthews PM. Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochim. Biophys. Acta*, 714(2):265–270, 1982.
- [6] Ogawa S and Lee TM. Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: In vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magn. Reson. Med.*, 16(1), 1990.
- [7] Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, Goldberg IE, Weisskoff RM, Poncelet BP, Kennedy DN, Hoppel BE, Cohen MS, Turner R, Cheng HM, Brady TJ, and Rosen BR. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5675–5679, 1992.
- [8] Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, Kim SG, Merkle H, and Ugurbil K. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: Functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5951–5955, 1992.
- [9] Bandettini PA, Wong EC, Scott HSR, Tikofsky RS, and Hyde J. Time course EPI of human brain function during task activation. *Magnetic resonance in medicine*, 25(2):390–397, 1992.
- [10] Nobre AC, Cristescu T, Gough PM, Lepsien J, Morgese C, O'Reilly J, Summerfield JJ, Rao A, Taylor PCJ, Vibell J, and Walker P. The cognitive MRI revolution. *MultiCiência*, 3, 2004.

- [11] Raichle ME. Functional brain imaging and human brain function. *The Journal of Neuroscience*, 23(10):3959–3962, 2003.
- [12] Nichols MJ and Newsome WT. The neurobiology of cognition. *Nature*, 402:35–38, 1999.
- [13] Wagner K, Frings L, Quiske A, Unterrainer J, Schwarzwald R, Spreer J, Halsband U, and Schulze-Bonhage A. The reliability of fMRI activations in the medial temporal lobes in a verbal episodic memory task. *NeuroImage*, 28:122–131, 2005.
- [14] Krishnan S, Slavin MJ, Tran TTT, Doraiswamy PM, and Petrella JR. Accuracy of spatial normalization of the hippocampus: Implications for fMRI research in memory disorders. *NeuroImage*, 31:560–571, 2006.
- [15] Sugiura M, Friston KJ, Willmes K, Shah NJ, Zilles K, and Fink GR. Analysis of intersubject variability in activation: An application to the incidental episodic retrieval during recognition test. *Human Brain Mapping*, 28:49–58, 2007.
- [16] Damasceno BP. A mente humana: abordagem neuropsicológica. *Revista MultiCiência*, 3:1–9, 2004.
- [17] Squire LR and Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*, 1991.
- [18] Heun R, Klose U, Jessen F, Erb M, Papassotiropoulos A, Lotze M, and Grodd W. Functional MRI of cerebral activation during encoding and retrieval of words. *Human Brain Mapping*, 8:157–169, 1999.
- [19] Reber PJ, Wong EC, and Buxton RB. Encoding activity in the medial temporal lobe examined with anatomically constrained fMRI analysis. *Hippocampus*, 12(3): 363 – 376, 2002.
- [20] Greicius MD and Krasnow B. Regional analysis of hippocampal activation during memory encoding and retrieval: fMRI study. *Hippocampus*, 13:164–174, 2003.
- [21] Moser MB and Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8:608–619, 1998.

- [22] Lepage M, Habib R, and Tulving E. Hippocampal PET activations of memory encoding and retrieval: the HIPER model. *Hippocampus*, 8:313–322, 1998.
- [23] Eichenbaum H. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44:109–120, 2004.
- [24] Ranganath C, Heller A, Cohen MX, Brozinsky CJ, and Rissman J. Functional connectivity with the hippocampus during successful memory formation. *Hippocampus*, 15:997–1005, 2005.
- [25] Eichenbaum H, Yonelinas AP, and Ranganath C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30:123–152, 2007.
- [26] Binder JR, Achten E, Constable RT, Detre JA, Gaillard WD, Jack CR, and Loring DW. Functional MRI in epilepsy. *Epilepsia*, 43:51–63, 2002.
- [27] Pauli E, Hildebrandt M, Romstöck J, Stefan H, and Blümcke I. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology*, pages 1383–1389, 2006.
- [28] Carnevalle AD, Rondina JM, Kobayashi E, Lotufo RA, and Cendes F. Validation of a semi-automated system for MRI-based hippocampal volumetry in patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Epilepsy Clinical Neurophysiology*, 09(02): 97–104, 2003.
- [29] Rondina JM, Cendes F, and Lotufo RA. Desenvolvimento de um sistema semi-automático para a segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética. CBIS'2002 - VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde, 2002.
- [30] Tzourio-Mazoyer N, Landeau B, Papathanassiou D, Crivello F, Etard O, Delcroix N, and et al. Automated anatomical labelling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single subject brain. *NeuroImage*, 15: 273–289, 2002.
- [31] Toosy AT, Ciccarelli O, Parker GJM, Wheeler-Kingshott CAM, Miller DH, and Thompson AJ. Characterizing function / structure relationships in the human visual system with functional MRI and diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 21(4): 1452–1463, 2004.

- [32] Tzourio N, Petit L, Mellet E, Orssaud C, Crivello F, Benali K, Salamon G, and Mazoyer B. Use of anatomical parcellation to catalog and study structure-function relationships in the human brain. *Human Brain Mapping*, 5:228–232, 1997.
- [33] Poldrack RA. Region of interest analysis for fMRI. *SCAN*, 2:67–70, 2007.
- [34] Martin JM and Hanlon CA. A post-processing region of interest (ROI) method for discriminating patterns of activity in statistical maps of fMRI data. *Journal of Neuroscience Methods*, 135:137–147, 2004.
- [35] Vigneau M, Jobard G, Mazoyer B, and Tzourio-Mazoyer N. Word and non-word reading: What role for the visual word form area? *NeuroImage*, 27:694–705, 2005.
- [36] Rabin ML, Narayan VM, Kimberg D, Casasanto DJ, Glosser G, Tracy JI, French JA, Sperling MR, and Detre JA. Functional MRI predicts post-surgical memory following temporal lobectomy. *Brain*, 127(10):2286–2298, 2004.
- [37] Tsukiura T, Mochizuki-Kawai H, and Fujii T. The effect of encoding strategies on medial temporal lobe activations during the recognition of words: An event-related fMRI study. *NeuroImage*, 25(2):452–461, 2005.
- [38] Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR and Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, and Nadel L. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J. Anat*, 207:35–66, 2005.
- [39] Edelman RR, Wielopolski P, and Schmitt F. Echo-planar MR imaging. *Radiology*, 192:600–612, 1994.
- [40] Dupont S, Van de Moortele PF, Samson S, Hasboun D, Poline JB, Adam C, Lehericy S, and Le Bihan D Baulac M. Episodic memory in left temporal lobe epilepsy: a functional MRI study. *Brain*, 123:1722–1732, 2000.
- [41] Holgersson R and Svärd M. Reconstruction of echo planar images used in functional MRI. Master's thesis, Linköping University, 2004.

- [42] Talairach J and Tournoux P. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain 3-dimensional proportional system: An approach to cerebral imaging. Stultgart, New York, 1988.
- [43] Friston KJ, Frith CD, Frackowlak RSJ, and Turner R. Characterizing dynamic brain responses with fMRI: A multivariate approach. *NeuroImage*, 30:166–172, 1995.
- [44] Kanwisher N, McDermott J, and Chun MM. The Fusiform Face Area: A Module in Human Extrastriate Cortex Specialized for Face Perception. *J. Neurosci.*, 17(11):4302–4311, 1997.
- [45] Friston KJ, Rotshtein P, Geng JJ, Sterzer P, and Henson RN. A critique of functional localisers. *NeuroImage*, 30:1077–1087, 2006.
- [46] Collins DL, Zijdenbos A, Kollokian V, Sled JG, Kabani NJ, Holmes CJ, and Evans AC. Design and construction of a realistic digital brain phantom. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 17:463–468, 1998.
- [47] Buckner RL. Functional–anatomic correlates of control processes in memory. *The Journal of Neuroscience*, 23(10):3999–4004, 2003.
- [48] Addis DR and McAndrews MP. Prefrontal and hippocampal contributions to the generation and binding of semantic associations during successful encoding. *NeuroImage*, 33(4):1194–1206, 2006.
- [49] Cohen MS and DuBois RM. Stability, repeatability, and the expression of signal magnitude in functional magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 10(1):33–40, 1999.
- [50] Hammers A, Allom R, and Koepp MJ. Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Human Brain Mapping*, 19:224–47, 2003.
- [51] Shattuck DW, Hojatkashani C, and Mirza M. Construction of a 3D probabilistic atlas of human brain structures. In *12th annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping*, 2006.

- [52] Zilles K, Amunts K, Eickhoff SB, Heim S. Testing anatomically specified hypotheses in functional imaging using cytoarchitectonic maps. *NeuroImage*, 32:570–582, 2006.
- [53] Nieto-Castanon A, Ghosh SS, Tourville JA, and Guenther FH. Region of interest based analysis of functional imaging data. *NeuroImage*, 19:1303–1316, 2003.
- [54] McKeown MJ and Hanlon CA. A post-processing/region of interest (ROI) method for discriminating patterns of activity in statistical maps of fMRI data. *Journal of Neuroscience Methods*, 135:137–147, 2004.
- [55] Bogorodzki P, Rogowska J, and Yurgelun-Todd DA. Structural group classification technique based on regional fMRI BOLD responses. *IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING*, 24(3):389–398, 2005.
- [56] Chen H, Yuan H, Yao D, Chen L, and Chen W. An integrated neighborhood correlation and hierarchical clustering approach of functional MRI. *IEE Transactions on Biomedical Engineering*, 53(3):452–458, 2006.
- [57] Lu Y, Jiang T, and Zang Y. Region growing method for the analysis of functional MRI data. *NeuroImage*, 20:455–465, 2003.
- [58] Lu Y, Jiang T, and Zang Y. A split-merge-based region-growing method for fMRI activation detection. *Human Brain Mapping*, 22(4):271–279, 2004.
- [59] Zang Y, Jiang T, Lu Y, Yong H, and Tian L. Regional homogeneity approach to fMRI data analysis. *NeuroImage*, 22:394–400, 2004.
- [60] Koch MA, Norris DG, and Hund-Georgiadis MH. An investigation of functional and anatomical connectivity using magnetic resonance imaging. *NeuroImage*, 16: 241–250, 2002.
- [61] Ramnani N, Behrens TEJ, Penny W, and Matthews PM. New approaches for exploring anatomical and functional connectivity in the human brain. *Biological Psychiatry*, 56(9):613–619, 2004.
- [62] Guye M, Parker GJ, Symms M, Boulby P, Wheeler-Kingshott CA, Salek-Haddadi A, Barker GJ, and Duncan JS. Combined functional MRI and tractography to demonstrate the connectivity of the human primary motor cortex in vivo. *NeuroImage*, 19(4):1349–1360, 2003.

- [63] Menon V, White CD, Eliez S, Glover GH, and Reiss AL. Analysis of distributed neural system involved in spatial information, novelty and memory processing. *Human Brain Mapping*, 11:117–129, 2000.
- [64] Kim J, Zhu W, Chang L, Bentler PM, and Ernst T. Unified structural equation modeling approach for the analysis of multisubject, multivariate functional MRI data. *Human Brain Mapping*, 28:85–93, 2007.
- [65] Tomasi D, Ernst T, Caparelli EC, and Chang L. Common deactivation patterns during working memory and visual attention tasks: an intra-subject fMRI study at 4 tesla. *Human Brain Mapping*, 27(8):694–705, 2006.
- [66] Damoiseaux JS, Rombouts SARB, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Smith SM, and Beckmann CF. Consistent resting-state networks across healthy subjects. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(37):13858–1853, 2006.
- [67] Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, and Menon V. Default-mode network activity distinguishes alzheimer’s disease from healthy aging: Evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(13):4637–4642, 2004.
- [68] Van de Ven VG, Formisano E, Prvulovic D, Roeder CH, and Linden DEJ. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. *Human Brain Mapping*, 22(3):165–178, 2004.
- [69] Minati L, Grisoli M, and Bruzzone MG. Spectroscopy, functional MRI, and diffusion-tensor imaging in teh aging brain: A conceptual review. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 20(3):3–21, 2007.
- [70] Salvador R, Suckling J, Coleman MR, Pickard JD, Menon D, and Bullmore E. Neurophysiological architecture of functional magnetic resonance images of human brain. *Cerebral Cortex*, 15(9):1332–1342, 2005.
- [71] Gusnard D and Raichle ME. Searching for a baseline: Functional imaging and the resting human brain. *Nature Reviews*, 2:685–694, 2001.
- [72] Fransson P. Spontaneous low-frequency bold signal fluctuations: An fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis. *Human Brain Mapping*, 26(1):15–29, 2005.