

Ricardo Cesar Giorgetti Landim

Utilização da fMRS para o estudo da variação de N-acetil-aspartato e N-acetil-aspartil-glutamato durante a ativação cerebral

Campinas 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGHIN

Ricardo Cesar Giorgetti Landim

Utilização da fMRS para o estudo da variação de N-acetil-aspartato e N-acetil-aspartil-glutamato durante a ativação cerebral

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Castellano

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física Gleb Wataghin para a obtenção do título de Mestre em Física.

Getwelth

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno e orientada pela Profa. Dra. Gabriela Castellano

> Campinas 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VALKÍRIA SUCCI VICENTE – CRB8/5398 - BIBLIOTECA DO IFGW UNICAMP

L234u	Landim, Ricardo Cesar Giorgetti, 1986- Utilização da fMRS para o estudo da variação de N-acetil- aspartato e N-acetil-aspartil-glutamato durante a ativação cerebral / Ricardo Cesar Giorgetti Landim Campinas, SP : [s.n.], 2013.
	Orientador: Gabriela Castellano. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Fisica "Gleb Wataghin".
	 Espectroscopia por ressonância magnética funcional. MEGA-PRESS. 3. N-acetil-aspartato. 4. N-acetil-aspartil- glutamato. I. Castellano, Gabriela, 1970- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Use of fMRS for the study of N-acetyl-aspartate and N-acetylaspartyl-glutamate variation during brain activation Palavras-chave em inglês: Functional magnetic resonance spectroscopy MEGA-PRESS N-acetylaspartate N-acetylaspartylglutamate Área de Concentração: Física Titulação: Mestre em Física Banca Examinadora: Gabriela Castellano [Orientador] Roberto José Maria Covolan Fernando Fernandes Paiva Data da Defesa: 15-03-2013 Programa de Pós-Graduação em: Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **RICARDO CESAR GIORGETTI LANDIM – R.A. 123473** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN", DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 15/03/2013.

COMISSÃO JULGADORA:

twieln

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

Prof. Dr. Fernando Pernandes Paiva - IF/USP

Drof Dr. Bakarta Jacó Mar

Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan DRCC/IFGW/UNICAMP

Dedicado aos meus avós maternos Ivo e Iracema, e ao meu irmão Tiago.

Agradecimentos

A minha mãe, Maria Aparecida, por sempre me incentivar (e obrigar, quando criança) a estudar. Ao meu pai, Ertes, por não medir esforços para me ajudar quando preciso e por ser um grande exemplo de homem e pai, o mais trabalhador e honesto que já conheci. À minha namorada, Mayara, por sempre me apoiar e incentivar, sobretudo nos momentos mais difíceis, e pela paciência, principalmente quando não fui a pessoa mais simpática e bem-humorada para se estar do lado.

A minha orientadora, Gabriela, pela incontável ajuda e apoio, desde antes do início do Mestrado; pelas inúmeras explicações acerca dos mais variados temas pertinentes ao projeto e pelas enriquecedoras discussões sobre a Física por trás da ressonância magnética. Ao Guilherme, pela gigantesca ajuda em MATLAB, pelas boas e importantes discussões sobre Física, pela amizade e pelo treino de espanhol. Ao Prof. Roberto, pelas sugestões que enriqueceram e deixaram este trabalho mais robusto. Ao Prof. Marcus Aguiar, pelas excelentes aulas de Mecânica Quântica e pelas esclarecedoras e vitais explicações após as mesmas, que no conjunto contribuíram para aumentar meu gosto pela Física e que me deram um novo panorama sobre a pesquisa acadêmica.

Ao pessoal da Rep. Komodo, pela amizade, ajuda e convivência durante estes anos. À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Resumo

As variações metabólicas que ocorrem no cérebro subjacentes à ativação neuronal ainda estão longe de ser bem compreendidas e, portanto, constituem objeto de estudo de grande interesse por parte da comunidade científica da área. Uma forma de estudar estas variações é por meio da técnica de espectroscopia funcional por ressonância magnética (functional Magnetic Resonance Spectroscopy – fMRS), na qual espectros de uma dada região cerebral são coletados de forma dinâmica, enquanto o indivíduo é sujeito a algum estímulo sensorial ou tarefa cognitiva. Em particular, o N-acetil-aspartato (NAA) é o metabólito que gera o principal pico encontrado em espectros cerebrais de espectroscopia por ressonância magnética utilizando o núcleo do hidrogênio. Na verdade, este pico provém do próprio NAA (90%) e também de um derivado deste, o N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG). Em experimentos de fMRS realizados por nosso grupo, foi encontrada variação de NAA e NAAG no córtex visual de indivíduos normais, quando estes são sujeitos à apresentação de um estímulo visual. Porém, as variações do sinal de MRS do NAA em experimentos de fMRS são um assunto controverso na literatura da área, pois há trabalhos que apontam para sua variação com o estímulo e outros que dizem que não há variações. Além disso, os trabalhos existentes na literatura mediram a variação conjunta de NAA e NAAG. Dessa forma, para elucidar o que acontece com estes metabólitos durante a ativação cerebral seria interessante medí-los separadamente. O objetivo principal deste trabalho foi, portanto, realizar experimentos de fMRS nos quais estes metabólitos pudessem ser medidos de forma independente, através da implementação da sequência de pulsos MEGA-PRESS, que separa as contribuições do NAA e NAAG já no momento da medida. Os experimentos foram realizados em sujeitos saudáveis durante estimulação visual. Foram realizados vários testes para se padronizar o pré-processamento e duas metodologias foram utilizadas. Diversas quantificações foram feitas e como resultado foram encontradas variações de NAA (diminuição) e NAAG (aumento) durante o estímulo. Os resultados concordam com os apresentados em dois dos três trabalhos similares encontrados na literatura, e também com os resultados anteriores de nosso grupo. A diminuição de NAA pode ser explicada através da hipótese de que ele funcione como uma bomba de água molecular, enquanto que a produção de NAAG concorda com o fato de que este metabólito é um neuropeptídeo que é liberado nas sinapses e atua como modulador para a liberação de certos neurotransmissores, e também concorda com modelos para o metabolismo energético que apontam para este metabólito como relacionado à resposta hiperêmica vascular que origina o sinal BOLD.

Abstract

Metabolic changes that occur in the brain underlying neuronal activation are still far form being understood and, therefore, are a subject matter of great interest for the scientific community of this research field. One way to study these variations is through the technique of functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS), in which spectra from a given brain region are collected dynamically, while the volunteer is subject to some sensory stimulus or cognitive task. In particular, N-acetyl-aspartate (NAA) is the metabolite that generates the main peak found the MR spectra of the brain using the hydrogen nucleus. Indeed, this peak originates from NAA itself (90 %) and also from a derivative thereof, N-acetylaspartyl-glutamate (NAAG). In fMRS experiments performed by our group, NAA and NAAG changes were found in the visual cortex of normal individuals when they are subject to a visual stimulus. However, the MRS signal variations of NAA in fMRS experiments are a controversial subject in the literature, since there are studies that point to its variation with the stimulus and others that show that there is no variation. In addition, the existing works measured the joint NAA and NAAG variation. Thus, to elucidate what happens to these metabolites during brain activation it would be interesting to measure them separately. The main objective of this study was, therefore, to perform fMRS experiments in which these metabolites could be measured independently by implementing the MEGA-PRESS pulse sequence, which separates the NAA and NAAG contributions at the time of measurement. The experiments were performed in healthy subjects during visual stimulation. Several tests were performed to standardize the preprocessing and two methods were used. Several quantifications were made and as result NAA and NAAG variations (decrease and increase, respectively) were found during the stimulus. The results agree with those presented in two out of three similar studies found in the literature, and also with the previous results from our group. The NAA decrease may be explained through the hypothesis that it works as a molecular water pump, whereas the NAAG production agrees with the fact that this metabolite is a neuropeptide that is released at the synapses and acts as a modulator for the release of certain neurotransmitters, and also agrees with models for energy metabolism that point to this metabolite as related to the vascular hyperemic response that originates the BOLD signal.

Conteúdo

Re	esumo	D		xi
Li	sta de	e Figur	ras	xix
Li	Lista de Tabelas xxx			xxxi
Li	sta de	e Abrev	viações x	xxiii
1.	Intro	odução		1
2.	Refe	erencial	l Teórico	5
	2.1.	Ressor	nância Magnética Nuclear	5
		2.1.1.	Paramagnetismo nuclear	5
		2.1.2.	Pulso de radiofrequência	8
		2.1.3.	Tratamento clássico	10
		2.1.4.	O processo de relaxação	11
		2.1.5.	O sinal de NMR	13
		2.1.6.	Deslocamento químico	13
		2.1.7.	Acoplamento J	15
	2.2.	Gradie	entes de campo e Sequências de Pulso	18
		2.2.1.	Gradientes de campo	18
		2.2.2.	Sequência PRESS	19
		2.2.3.	Sequência MEGA-PRESS	19
	2.3.	N-acet	til-aspartato e N-acetil-aspartil-glutamato	21
	2.4.	Exper	imentos anteriores	22
		2.4.1.	Características dos experimentos	23

	2.4.2.	Resultados e discussões dos experimentos anteriores	26
3. E	xperimen	tos Realizados	29
3.	.1. Parân	netros de aquisição	29
3.	.2. Parad	igma e Estímulo	31
3.	.3. Sujeit	OS	32
4. A	nálise do	s Dados e Resultados	33
4.	.1. Prime	eiro conjunto de resultados	35
	4.1.1.	Padronização do pré-processamento	35
	4.1.2.	Análise através da média de todos os sujeitos	36
	4.1.3.	Primeira análise através da área sob o pico	38
	4.1.4.	Análise através da altura do pico – Primeira linha de base $\ .\ .\ .$	44
	4.1.5.	Análise através da altura do pico – Segunda linha de base $\ .\ .\ .$	50
	4.1.6.	Análise através da altura do pico – Terceira linha de base	52
	4.1.7.	Análise através da área sob o pico	54
	4.1.8.	Análise através da altura do pico – Espectro absoluto 	63
	4.1.9.	Análise através da área sob o pico – Espectro absoluto $\ . \ . \ . \ .$	67
	4.1.10	. Resumo dos resultados obtidos	70
4.	.2. Segun	do conjunto de resultados	77
	4.2.1.	Análise através da altura do pico	77
	4.2.2.	Análise através da altura do pico – Espectro absoluto 	84
	4.2.3.	Análise através da área sob o pico	89
	4.2.4.	Análise através da altura do pico – Espectro real sem linha de base	97
	4.2.5.	Análise através da altura do pico – Quarta linha de base $\ .\ .\ .\ .$	97
	4.2.6.	Análise através da altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
		absoluto	105
	4.2.7.	Análise através da área sob o pico – Quarta linha de base	112
	4.2.8.	Análise através da área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro	
		absoluto	114
	4.2.9.	Resumo dos resultados obtidos	118
4.	.3. Quant	tificação dos espectros não editados	125
	4.3.1.	Quantificação com o MATLAB	125
	4.3.2.	Quantificação com o LCModel	128

5.	Discussões	135
6.	Conclusão e perspectivas futuras	141
Α.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	145
В.	Lista de Publicações	147
Bi	bliografia	153

Lista de Figuras

1.1.	Adaptada de [1]. Espectro de hidrogênio com o pico de NAA+NAAG mais	
	proeminente marcado em vermelho	2
2.1.	Adaptada de [16]. Na ausência de campo magnético externo os spins nuclea-	
	res orientam-se randomicamente, como esta representado has duas formas	٣
2.2	mostradas aqui.	5 0
2.2.	Adaptada de [17]. Campos microscópicos	6
2.3.	Adaptada de [17]. Possíveis orientações do momento magnético de spin de	
	um núcleo devido ao ambiente térmico em que se encontra. \ldots	7
2.4.	Adaptada de [1]. Magnetização longitudinal sujeita ao pulso de radiofrequên-	
	cia vista no referencial do laboratório	8
2.5.	Adaptada de [16]. Momentos magnéticos e magnetização longitudinal (seta	
	mais grossa acima), vista no sistema girante, antes do pulso de radiofrequência	
	(esquerda) e durante o pulso (direita).	9
2.6.	Adaptada de [17]. Precessão da magnetização transversal (seta em cinza	
	claro) no plano x - y	12
2.7.	Adaptada de [1]. Magnetização ${\bf M}$ durante a relaxação	12
2.8.	Adaptada de [17]. Indução de um sinal de NMR	13
2.9.	Adaptada de [17]. Etapas do deslocamento químico	14
2.10.	. Adaptada de [22]. Dubleto-de-dubletos do NAA centrados em 2,49, 2,67 e	
	4,38ppm correspondentes aos prótons dos grupos CH_2 e CH do radical de	
	aspartato. Outro dubleto aparece em 7,82 ppm devido ao grupo amido NH .	15
2.11.	Adaptado de [17]. Conjunto de spins pareados com a mesma energia, devido	
	ao princípio de exclusão de Pauli.	16

2.12.	Adaptado de [1]. O contato de Fermi favorece a orientação antiparalela entre	
	os spins nuclear e eletrônico	16
2.13.	Adaptada de [1]. Quatro possíveis orientações para dois átomos com elétrons	
	compartilhados. Os estados de menor energia são o segundo e terceiro, onde	
	os spins nucleares estão orientados antiparelelamente com relação aos spins	
	eletrônicos.	16
2.14.	Adaptada de [25]. O sinal à direita, correspondente aos dois prótons de H_a ,	
	está dividido em dois subpicos e é chamado dubleto. Já o sinal à esquerda,	
	correpondente a o ${\cal H}_b,$ está dividido em três picos por causa das diferentes	
	orientações possíveis dos núcleos e é chamado tripleto	17
2.15.	Adaptada de [25]. Dubleto-de-dubleto de H_c	18
2.16.	Adaptada de http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/. Na primeira imagem (à	
	esquerda) há uma fatia com os spins precessionando com mesma frequência,	
	devido ao campo $\mathbf{B_0}.~$ Essa fatia foi selecionada com a aplicação de um	
	primeiro gradiente, não mostrado. Com a aplicação do segundo gradiente	
	(G_{ϕ}) muda-se a intensidade na direção horizontal, portanto agora existem	
	três faixas com três spins precessionando na mesma frequência (imagem do	
	meio). Por fim, o terceiro gradiente é aplicado (G_f) mudando a intensidade	
	do campo no eixo vertical. Devido a essa mudança, cada um dos nove spins	
	possui uma combinação única de fase e frequência de precessão (imagem à	
	direita). Com a combinação destes três gradientes é possível selecionar uma	
	área específica do cérebro, por exemplo, de forma a adquirir o sinal somente	
	desta área (como será visto na próxima seção)	19
2.17.	Adaptada de [26]. Sequência PRESS. O pulso CHESS é usado para suprimir	
	o sinal da água.	20
2.18.	Adaptada de [27]. Sequência MEGA-PRESS	20
2.19.	Estímulo visual usado nos experimentos de Castellano $et \ al. \ [11]$, Baslow et	
	al. [12] e Mangia et al. [14]. \ldots	24
2.20.	Paradigma usado no experimento de Sarchielli <i>et al.</i> [13]	24
2.21.	Paradigmas usados no experimento de Baslow <i>et al.</i> [12]	25
2.22.	Paradigmas usados no experimento de Mangia <i>et al.</i> [14]	25
2.23.	Paradigma usado no experimento de Castellano <i>et al.</i> [11]	25
3.1.	Exemplo de espectro adquirido no experimento de fMRS	30

Adaptada de [15]. Ressonâncias de interesse utilizadas na sequência MEGA-	
PRESS, para o experimento de NAA (direita) e NAAG (esquerda)	30
Paradigma utilizado.	30
Estímulo visual utilizado.	31
Posicionamento do voxel de MRS	31
 a) Espectros finais após correção de fase do pico de NAA para um sujeito (experimento de NAA) - notam-se os picos residuais bem visíveis em 2ppm. b) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de NAA) – neste caso não há picos residuais em 2ppm, como esperado. c) Espectros finais após correção de fase do pico de NAA para um sujeito (experimento de NAAG) – novamente veem-se os picos residuais em 2ppm. d) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de 	
NAAG) – não há picos residuais em 2ppm	36
corrigida (abaixo)	37
Porcentagem de variação do NAA para a soma de 15 sujeitos	38
Exemplo de espectro ímpar, com o pico de NAA em torno de 2.5ppm (figura	00
ampliada abaixo) não suprimido.	39
Exemplo de espectro par, com o pico de NAA em torno de 2,5ppm suprimido	
(figura ampliada abaixo)	40
Exemplo de espectro para o experimento de NAA, após todas as estapas de	
pré-processamento. O pico de NAA está em torno de 2,5ppm, como mostra a	
figura ampliada abaixo. O pico em torno de 4,8ppm é o pico residual da água.	41
Exemplo de espectro para o experimento de NAAG, após todas as estapas de	
pré-processamento. O pico de NAAG está em torno de 2,5ppm, como mostra	
a figura ampliada abaixo. O pico em torno de 4,8ppm é o pico residual da	
água	42
Variação percentual para 18 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
diminuição de NAA durante o estímulo	43
Variação percentual do NAA para os 2 sujeitos restantes	44
Acima, espectros tomados como exemplo [15]; abaixo, espectros finais para	
um sujeito, faseados de forma a ficarem o mais parecido possível com o exemplo.	45
. Linha de base estimada para espectros de NAA e NAAG	45
	Adaptada de [15]. Ressonâncias de interesse utilizadas na sequência MEGA- PRESS, para o experimento de NAA (direita) e NAAG (esquerda) Paradigma utilizado

4.12.	Variação percentual para 17 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de
	diminuição do NAA durante o estímulo. Altura do pico – Primeira linha de
	base
4.13.	Variação percentual do NAA para os 3 sujeitos restantes. Altura do pico –
	Primeira linha de base
4.14.	Variação percentual para 14 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de
	aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Primeira linha de
	base
4.15.	Variação percentual para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico – Primeira
	linha de base.
4.16.	Variação percentual do NAA para os dois dados do Sujeito 1. Altura do pico
	– Primeira linha de base
4.17.	Variação percentual do NAAG para os dois dados do Sujeito 7. Altura do
	pico – Primeira linha de base
4.18.	Variação percentual para os 16 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de
	diminuição do NAA durante o estímulo. Altura do pico – Segunda linha de
	base
4.19.	Variação percentual do NAA para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico –
	Segunda linha de base
4.20.	Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de
	aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Segunda linha de
	base
4.21.	Variação percentual do NAAG para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico –
	Segunda linha de base
4.22.	Variação percentual do NAA para os dois dados do Sujeito 1. Altura do pico
	– Segunda linha de base
4.23.	Variação percentual do NAAG para os dois dados do Sujeito 7. Altura do
	pico – Segunda linha de base.
4.24.	Linha de base estimada para espectros de NAA e NAAG
4.25.	Variação percentual para 17 sujeitos que seguiram padrão semelhante de
	diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Terceira linha de
	base
4.26.	Variação percentual dos 3 sujeitos restantes, que seguiram padrão de aumento
	de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Terceira linha de base

4.27	. Variação percentual do NAA para as duas aquisições do Sujeito 1. Altura do	
	pico – Terceira linha de base.	56
4.28	. Primeiro (em azul) e quarto (em verde) espectro do Sujeito 9 para o expe-	
	rimento de NAAG. A área sob o pico de NAAG (em torno de 2,5ppm) no	
	quarto espectro não é 10 vezes maior que a área do primeiro espectro. \ldots	57
4.29	. Variação percentual para os 12 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico com linha de base.	58
4.30	. Variação percentual para os 8 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico com linha de base	58
4.31	. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Área sob o pico com linha de base.	59
4.32	. Variação percentual para 18 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico	59
4.33	. Variação percentual para 2 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico	60
4.34	. Variação percentual para 9 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	aumento de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico	60
4.35	. Variação percentual para 8 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	decréscimo de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico	61
4.36	. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Área sob o pico	62
4.37	. Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
	Área sob o pico	62
4.38	. Picos de NAA (acima) e NAAG (abaixo) em torno de 2,5ppmem para um	
	espectro absoluto de hidrogênio	64
4.39	. Variação percentual para 19 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	decréscimo de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.	64
4.40	. Variação percentual para 1 sujeito que seguiu padrão diferente do grupo da	
	Figura 4.39. Altura do pico – Espectro absoluto	65
4.41	. Variação percentual para 16 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.	65
4.42	. Variação percentual para os 2 sujeitos restantes, cujos valores não acompa-	
	nharam o padrão apresentado na Figura 4.41. Altura do pico – Espectro	
	absoluto	66

4.43.	Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Altura do pico – Espectro absoluto.	66
4.44.	Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
	Altura do pico – Espectro absoluto.	67
4.45.	Variação percentual para 5 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	decréscimo de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.	68
4.46.	Variação percentual para 15 sujeitos que seguiram padrão aumento de NAA	
	durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto	68
4.47.	Variação percentual para 4 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	aumento de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.	69
4.48.	Variação percentual para 14 sujeitos que seguiram padrão semelhante de	
	decréscimo de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.	69
4.49.	Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Área sob o pico – Espectro absoluto.	70
4.50.	Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
	Área sob o pico – Espectro absoluto.	71
4.51.	Variação percentual do NAA para dois sujeitos, utilizando passos de 5 (figuras	
	à esquerda, uma para cada sujeito) e de 10 (figuras à direita, uma para cada	
	sujeito). Os dezoito (para passo de 5), ou nove (para passo de 10), pontos no	
	eixo das abscissas correpondem a cada um dos dezoito, ou nove, espectros	
	resultantes.	78
4.52.	Primeiro espectro (de 9) para o Sujeito 1, no experimento de NAA. O pico	
	de NAA está em torno de 2,5ppm	79
4.53.	Primeiro espectro (de 9) para o Sujeito 1, no experimento de NAAG. O pico	
	de NAAG está em torno de 2,5ppm	80
4.54.	Exemplo de espectro para experimento de NAA, com a terceira tentativa de	
	linha de base	80
4.55.	Exemplo de espectro para experimento de NAAG, com a terceira tentativa	
	de linha de base. \ldots	81
4.56.	Variação percentual para os 16 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de	
	diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico	81
4.57.	Variação percentual para os 3 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
	NAA durante o estímulo. Altura do pico	82

4.58.	Variação percentual para os 15 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de	
	aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico	82
4.59.	Variação percentual para os 3 sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
	de NAAG durante o estímulo. Altura do pico	83
4.60.	Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
	de NAA durante o estímulo. Note que estas não são barras de erro, e sim	
	barras que indicam a faixa do desvio padrão dos sujeitos com relação à média.	
	Altura do pico.	83
4.61.	Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento	
	de NAAG durante o estímulo. Note que estas não são barras de erro, e	
	sim barras que indicam a faixa do desvio padrão dos sujeitos com relação à	
	média. Altura do pico	84
4.62.	Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Altura do pico.	85
4.63.	Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
	Altura do pico.	85
4.64.	Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de	
	diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.	86
4.65.	Variação percentual para o sujeito que apresentou aumento de NAA durante	
	o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto. 	87
4.66.	Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de aumento	
	de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto	87
4.67.	Variação percentual para os 6 sujeitos que apresentaram padrão de decréscimo	
	de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto	88
4.68.	Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
	de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto	88
4.69.	Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
	de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto	89
4.70.	Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
	Altura do pico – Espectro absoluto.	90
4.71.	Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
	Altura do pico – Espectro absoluto.	90

4.72. Primeiro (azul) e terceiro (vermelho) espectros do Sujeito 13 para o experi-
mento de NAAG, com as respectivas linhas de base (verde escuro e verde
água)
4.73. Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de dimi-
nuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Terceira linha de
base
4.74. Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de aumento
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Terceira linha de base
4.75. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.
Área sob o pico – Terceira linha de base.
4.76. Variação percentual para os 15 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Sem linha de base
4.77. Variação percentual dos 4 sujeitos que seguiram o padrão contrário de variação
de NAA. Área sob o pico – Sem linha de base
4.78. Primeiro (em azul) e sexto (em vermelho) espectros do Sujeito 20, cuja
variação percentual chegou a 800%. A linha à esquerda do espectro vermelho
está mais para cima do que a mesma região no espectro azul. Isso faz com
que o valor da área seja maior para o espectro vermelho
4.79. Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Sem linha de base
4.80. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.
Área sob o pico – Sem linha de base.
4.81. Exemplo de linha de base e espectro absoluto para o experimento de NAA.
Pela figura se vê esta linha de base (terceira tentativa) não acompanha o
pico de NAA em aproximadamente 2.5ppm
4.82. Exemplo de linha de base e espectro absoluto para o experimento de NAAG.
Pela figura se vê esta linha de base (terceira tentativa) não acompanha o
pico de NAAG em aproximadamente 2.5ppm.
4.83. Exemplo de espectro de NAA, com a linha do ruído praticamente paralela
ao eixo horizontal.
4.84. Exemplo de espectro de NAAG, com a linha do ruído não paralela ao eixo
horizontal.
4.85. Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Sem linha de base
r r

4.86. Variação percentual o sujeito que seguiu o padrão contrário de variação.	
Altura do pico – Sem linha de base	99
4.87. Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Sem linha de base	100
4.88. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
Altura do pico – Sem linha de base	100
4.89. Exemplo de espectro para experimento de NAA, com a quarta tentativa de	
linha de base	101
4.90. Exemplo de espectro para experimento de NAAG, com a quarta tentativa de	
linha de base	101
4.91. Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo	
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base. \ldots .	102
4.92. Variação percentual para o sujeito que seguiu o padrão contrário de variação	
para o NAA. Altura do pico – Quarta linha de base	103
4.93. Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o padrão de aumento	
de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base. $\ .$.	103
4.94. Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão contrário de	
variação para NAAG. Altura do pico – Quarta linha de base	104
4.95.Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base. \ldots .	104
4.96.Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento	
de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base. \ldots	105
4.97. Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
Altura do pico – Quarta linha de base	106
4.98. Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
Altura do pico – Quarta linha de base	106
4.99. Variação percentual para os 8 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo	
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	107
4.100Variação percentual para os 11 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	108

4.101 Variação percentual para os 5 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	108
4.102 Variação percentual para os 13 sujeitos que seguiram o padrão contrário de	
variação para NAAG. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	109
4.103 Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	109
$4.104 \mathrm{Varia}$ ção percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto	110
$4.105 \mathrm{Varia}$ ção percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição	
de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base –	
Espectro absoluto.	110
4.106 Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto	111
4.107 Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto	111
4.108 Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo	
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base. $\ .\ .$	112
4.109 Variação percentual dos 5 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base. \ldots .	113
4.110 Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento	
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base. $\ .\ .$	113
4.111Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
Área sob o pico – Quarta linha de base	114
4.112 Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo	
de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base –	
Espectro absoluto.	115
4.113 Variação percentual dos 15 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de	
NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro	
absoluto.	115

4.114.Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão de aumento	
de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base –	
Espectro absoluto.	116
4.115.Variação percentual dos 14 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo	
de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base –	
Espectro absoluto.	116
4.116.Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1.	
Area do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto	117
4.117 Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7.	
Area do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto	117
4.118 Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para 18 sujeitos do	
experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro real	125
4.119Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2 ppm para os Sujeitos 4 e	
15 do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro real.	126
4.120Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2 ppm para 20 sujeitos do	
experimento de NAAG. Quantificação com o MATLAB – Espectro real $$.	126
4.121Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2 ppm para 18 sujeitos do	
experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro absoluto.	127
4.122Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2 ppm para os Sujeitos 4	
e 15 do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro	
absoluto	127
4.123Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2 ppm para 20 sujeitos do	
experimento de NAAG. Quantificação com o MATLAB – Espectro absoluto.	128
4.124 Variação percentual do NAA para 18 sujeitos do experimento de NAA.	
Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA	129
4.125.Variação percentual do NAA para os Sujeitos 4 e 15 do experimento de NAA.	
Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA	129
4.126.Variação percentual do NAAG para o Sujeito 13 do experimento de NAA.	
Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA	130
4.127 Variação percentual do NAA+NAAG para 17 sujeitos do experimento de	
NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA	130
4.128Variação percentual do NAA+NAAG para os Sujeitos 4, 12 e 15 do experi-	
mento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA	131

4.129Variação percentual do NAA para 18 sujeitos do experimento de NAA.	
Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG	131
$4.130 \mathrm{Varia}$ ção percentual do NAA para os Sujeitos 4 e 10 do experimento de	
NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG	132
4.131 Variação percentual do NAA+NAAG para 17 sujeitos do experimento de	
NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG	132
4.132 Variação per centual do NAA+NAAG para os Sujeitos 2, 4 e 10 do experi-	
mento de NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG.	133
	105
5.1. Resumo esquematico das analises feitas no Capitulo 4	135

Lista de Tabelas

Principais parâmetros dos experimentos aqui comparados. Cada um deles é	
referido pelo nome do primeiro autor	23
Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para	
o NAA. Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se	
enquadraram, conforme foi explicado no início deste capítulo	72
Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para	
o NAAG. Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se	
enquadraram, conforme foi explicado no início deste capítulo	74
Intervalo de variações percentuais dos sujeitos para cada padrão de variação	
do NAA e do NAAG	76
Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para	
o NAA. Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se	
enquadraram, conforme foi explicado no início deste capítulo	119
Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para	
o NAAG. Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se	
enquadraram, conforme foi explicado no início deste capítulo	121
Intervalo de variações percentuais dos sujeitos para cada padrão de variação	
do NAA e do NAAG	124
	Principais parametros dos experimentos aqui comparados. Cada um deles e referido pelo nome do primeiro autor

Lista de Abreviações

AcCo	Coenzima acetil A
ADP	Adenosina difosfato
AMARES	Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient
	Spectral fitting of MRS data
ATP	Adenosina trifosfato
BOLD	Blood-Oxygen-Level Dependent
CHESS	Chemical-Shift-Selective
CRB	Cramér-Rao bound
FID	Free Induction Decay
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging
fMRS	functional Magnetic Resonance Spectroscopy
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glc	Glicose
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
LCModel	Linear Combination of Model spectra
MR	Magnetic Resonance
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
NAA	N-acetil-aspartato
NAAG	N-acetil-aspartil-glutamato
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSA	Number of Spectral Averages
PRESS	Point Resolved Spectroscopy
RF	Radiofrequência
SNR	Signal-to-Noise Ratio
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
TE	Tempo ao Eco
TR	Tempo de Repetição

Introdução

As variações metabólicas que ocorrem no cérebro subjacentes à ativação neuronal ainda estão longe de ser bem compreendidas e quantificadas, portanto, constituem objeto de estudo de grande interesse por parte da comunidade científica da área. Uma forma de estudar estas variações é por meio da técnica de espectroscopia funcional por ressonância magnética (fMRS, do inglês *functional Magnetic Resonance Spectroscopy*), na qual espectros de uma dada região cerebral são coletados de forma dinâmica, enquanto o indivíduo é sujeito a algum estímulo sensorial ou tarefa cognitiva. A espectroscopia por ressonância magnética (MRS, de *Magnetic Resonance Spectroscopy*) utilizando o núcleo do hidrogênio é uma técnica não-invasiva, que não utiliza radiação ionizante e que permite avaliar alguns metabólitos cerebrais específicos, como o N-acetil-aspartato (NAA), a creatina , a fosfocreatina , o grupo colina, o glutamato (Glu), a glutamina (Gln), e o lactato, entre outros [1]. Estes metabólitos possuem diferentes papéis, ainda não muito bem estabelecidos, dentro do metabolismo cerebral.

O NAA, em particular, é o metabólito que está presente em maior concentração no sistema nervoso central (SNC) [2] e que gera o principal pico encontrado em espectros de hidrogênio cerebrais (Figura 1.1). Na verdade, este pico provém do próprio NAA (90%) e



Figura 1.1.: Adaptada de [1]. Espectro de hidrogênio com o pico de NAA+NAAG mais proeminente marcado em vermelho.

também de um derivado deste, o N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG). A função precisa do NAA ainda não é conhecida, mas em neurologia clínica usando MRS tem sido aceito que o NAA é um marcador neuronal. Estudos clínicos em pacientes com epilepsia, Alzheimer, e outras condições bem estabelecidas que levam à morte ou disfunção neuronal, mostraram um decréscimo no sinal de MRS do NAA [3, 4]. De fato, foi mostrado que o sinal do NAA varia com o tempo em paralelo ao estado clínico, demonstrado em pacientes com epilepsia que foram sujeitos ao tratamento cirúrgico para controlar as crises. Os pacientes que se tornaram livres das crises após a cirurgia mostraram uma melhora no seu sinal de MRS do NAA, e os que continuaram a ter crises permaneceram com um sinal de NAA baixo [5].

O pico mais proeminente em espectros de hidrogênio cerebrais está localizado em ~2ppm com contribuições na proporção de aproximadamente 5-10:1 (NAA:NAAG) [6]. O NAA está associado à integridade neuronal [2] e o NAAG tem sido apontado como responsável pela resposta hiperêmica vascular que origina o sinal BOLD [7]. Medidas de NAA e NAAG separadas utilizando MRS são difíceis devido à grande superposição de seus espectros, porém métodos de pré-processamento tais como o LCModel [8] têm sido usados com esta finalidade [6, 9, 10]. Utilizando este método nosso grupo encontrou anteriormente resultados interessantes para a variação dos dois metabólitos: o NAA teve uma queda de 20% associada ao estímulo visual, acompanhado de um aumento de 200% no NAAG, de modo que a soma dos dois metabólitos permaneceu aproximadamente constante durante o experimento [11]. Pouquíssimos trabalhos na literatura reportaram resultados similares [12, 13, 14], provavelmente devido à dificuldade inerente em separar as contribuições desses
compostos em um espectro de MRS. Recentemente, Edden e colaboradores usaram uma sequência de pulsos MEGA-PRESS para medir separadamente as contribuições destes metabólitos em um experimento de MRS "estático" [15]. Devido aos resultados que o grupo obteve [11], buscou-se através deste projeto estudar as variações de NAA e NAAG separadamente, utilizando a sequência de pulsos MEGA-PRESS para edição de espectros, para confirmar ou refutar os mesmos.

Esta dissertação está estruturada da seguinte maneira. No Capítulo 2 é feita uma revisão dos processos físicos por trás do fenômeno de ressonância magnética nuclear, bem como das sequências de pulsos PRESS e MEGA-PRESS e dos metabólitos NAA e NAAG; também serão abordados os resultados obtidos anteriormente na literatura. O Capítulo 3 possui a descrição do experimento feito neste trabalho. O Capítulo 4 apresenta os resultados do projeto, o Capítulo 5 as discussões destes resultados e o Capítulo 6 mostra as conclusões e perspectivas futuras do trabalho.

Referencial Teórico

2.1. Ressonância Magnética Nuclear

2.1.1. Paramagnetismo nuclear

O spin nuclear é o conceito base por trás do fenômeno de ressonância magnética nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance – NMR*), responsável pelo funcionamento de um típico aparelho de ressonância magnética. Na ausência de qualquer campo magnético



Figura 2.1.: Adaptada de [16]. Na ausência de campo magnético externo os spins nucleares orientam-se randomicamente, como está representado nas duas formas mostradas aqui.



Figura 2.2.: Adaptada de [17]. Campos microscópicos.

externo, à temperatura ambiente, os spins nucleares de uma amostra ficam orientados aleatoriamente, como mostra a Figura 2.1. Quando um núcleo atômico fica sujeito a um campo magnético externo constante e homogêneo, o momento de dipolo magnético do núcleo começa a precessionar ao redor do campo com uma frequência dada pela equação de Larmor

$$\boldsymbol{\omega}_{\mathbf{0}} = \gamma \mathbf{B}_{\mathbf{0}} \tag{2.1}$$

onde γ é a razão giromagnética do núcleo, que varia para cada elemento, podendo ser positiva ou negativa dependendo se o momento magnético está na direção do spin (como acontece para a maioria dos núcleos atômicos) ou se está no sentido contrário (para elétrons e alguns núcleos), respectivamente. No caso do hidrogênio, que é o núcleo de interesse neste trabalho, o valor dessa constante é $268 \times 10^6 \ rad \ s^{-1} \ T^{-1}$. É importante notar que a frequência de precessão (conhecida como frequência de Larmor) além de variar de núcleo para núcleo, depende também do valor do campo magnético externo¹.

Quando uma amostra é submetida a um campo magnético externo os spins de todos os núcleos começam a precessionar com a frequência específica dada pela equação (2.1), e possuem, a princípio, uma distribuição de polarização isotrópica². Contudo, devido ao ambiente em que se encontram, ou seja, aos núcleos vizinhos, o campo magnético que determinado núcleo sente será a soma do campo externo e constante, \mathbf{B}_0 , com um pequeníssimo campo, variante no tempo e com qualquer possível direção no espaço, devido a esses núcleos vizinhos. Então, em um dado momento o campo magnético sentido por qualquer spin nuclear é ligeiramente diferente de seu vizinho, tanto em magnitude quanto direção (Figura 2.2).

¹Como o campo que foi usado neste estudo é de 3T, a frequência de precessão do hidrogênio para esse campo é de 128MHz.

 $^{^{2}}$ Isso significa também que o ângulo formado entre dois spins quaisquer não muda, caso os spins não interajam com os vizinhos, como está mostrado em [16].



Figura 2.3.: Adaptada de [17]. Possíveis orientações do momento magnético de spin de um núcleo devido ao ambiente térmico em que se encontra.

Apesar dessa variação ser extremamente pequena³, ela é importante porque a longo prazo permite que a isotropia da polarização do spin nuclear seja quebrada e contribua para o surgimento de uma magnetização. Essa pequena flutuação do campo magnético local devido ao ambiente térmico causa uma variação angular gradual no cone de precessão do spin nuclear. Isso significa que a cada momento determinado spin precessionará em um cone ligeiramente diferente do anterior; em outras palavras, significa que o ângulo entre o momento magnético de spin do núcleo e o campo magnético sentido por ele varia ligeiramente, podendo eventualmente cobrir uma série de orientações, como mostra a Figura 2.3.

O período de precessão de um spin nuclear (dado pelo inverso da frequência de Larmor) é da ordem de nanossegundos, enquanto que o tempo entre mudanças do cone de precessão é frequentemente da ordem de segundos. Isso significa que tipicamente o spin precessiona milhões de vezes antes de variar consideravelmente seu cone de ângulo constante [17].

Além disso, esta variação angular entre o momento magnético de spin e o campo externo não é isotrópica, pois como o ambiente possui temperatura finita a probabilidade de o spin se orientar em uma direção com energia menor (i.e., paralela ao campo) é maior do que no caso contrário, como vemos por

$$U = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B_0} \tag{2.2}$$

onde U é a energia potencial adquirida pelo núcleo devido ao campo $\mathbf{B}_0 \in \boldsymbol{\mu}$ é o momento magnético de spin, que no caso do hidrogênio é no mesmo sentido de seu spin.

Essa tendência dos momentos magnéticos se orientarem paralelamente ao campo cria uma distribuição anisotrópica estável, chamada de *equilíbrio térmico* [17], que embora seja estável, não é estática microscopicamente, como é fácil perceber. Consequentemente, devido à variação no cone de precessão e à tendência dos spins de se alinharem com o campo

³Para prótons em uma amostra de água em um campo de 11,4T, o campo magnético local no núcleo varia sua direção em apenas cerca de 10^{-4} graus [17].

magnético externo, surge uma magnetização ao longo do campo (chamada de magnetização longitudinal), fenômeno conhecido também como paramagnetismo nuclear.

2.1.2. Pulso de radiofrequência

A magnetização longitudinal é quase indetectável e cerca de quatro vezes menor em magnitude que o diamagnetismo da amostra devido aos elétrons [17]. Então, para extrair alguma informação da amostra é necessário fazer algo mais, e ao invés de medir a magnetização longitudinal mede-se a magnetização transversal.

Conforme foi dito antes, quando a amostra é posta em um campo magnético constante todos os spins começam a precessionar com a mesma frequência ω_0 . Alguns spins já estão alinhados ao campo externo tanto paralelamente quanto antiparalelamente, porém a maioria possui ângulos intermediários e devido ao movimento de variação do cone pelo qual precessionam e à tendência de se alinharem na direção de menor energia, surge a magnetização longitudinal. Transversalmente, porém, não há magnetização, pois como a distribuição no equilíbrio térmico é simétrica ao redor do eixo z (eixo posicionado na direção do campo \mathbf{B}_0), os momentos magnéticos de spin em qualquer outra direção se cancelam mutuamente, restando magnetização somente ao longo deste eixo.



Figura 2.4.: Adaptada de [1]. Magnetização longitudinal sujeita ao pulso de radiofrequência vista no referencial do laboratório.

Caso um novo campo magnético seja aplicado sobre a amostra, os spins evidentemente passarão a precessionar também ao redor deste novo campo. O movimento de precessão total fica, contudo, um pouco mais complicado de se visualizar no referencial do laboratório, sendo mais conveniente trabalhar em um sistema girante no qual os spins que precessionam ao redor de \mathbf{B}_0 estão estacionários⁴. Dessa forma, quando aplica-se o segundo campo, que

 $^{^{4}}$ Um tratamento mais detalhado sobre sistemas girantes pode ser encontrado no Capítulo 3 de [18].



Figura 2.5.: Adaptada de [16]. Momentos magnéticos e magnetização longitudinal (seta mais grossa acima), vista no sistema girante, antes do pulso de radiofrequência (esquerda) e durante o pulso (direita).

na realidade é um pulso eletromagnético polarizado circularmente⁵ no plano transversal com uma determinada frequência na faixa das ondas de rádio (chamado de *pulso de radiofrequência*), os momentos magnéticos de spin, vistos no sistema girante, precessionarão ao redor do novo campo aplicado. Como cada spin precessionará da mesma maneira ao redor deste novo campo, a magnetização longitudinal também acompanhará esta mudança. Assim, é dito que a magnetização é rotacionada de certo ângulo em direção ao plano transversal (plano x-y). A magnetização é rotacionada de modo mais eficaz em direção ao plano transversal se a frequência do pulso de RF for igual à frequência de precessão do núcleo ω_0 , e é efetivamente tombada para este plano se o pulso de RF tiver duração suficiente para causar uma rotação de $\pi/2$ na magnetização. No caso em que o pulso de RF possui esta mesma frequência ω_0 , o segundo campo, denominado **B**₁, fica estacionário no sistema girante. Pode-se visualizar como a magnetização vai para o plano transversal no sistema do laboratório e girante pelas Figuras 2.4 e 2.5, respectivamente.

Como o pulso de RF tem uma duração finita, certo tempo após sua cessação a magnetização transversal desaparecerá e a longitudinal reaparecerá no eixo z. Esses fenômenos são conhecidos como relaxação transversal e relaxação longitudinal, respectivamente. O fenômeno de relaxação será tratado novamente na Seção 2.1.4.

⁵O pulso deve ser polarizado circularmente para que sua amplitude no sistema girante seja total, i.e., para que possa ser utilizada integralmente para tombar a magnetização longitudinal. No caso de um pulso polarizado linearmente, por exemplo, a média do campo no sistema girante vale metade da amplitude do campo no sistema do laboratório, ou seja, somente metade da amplitude no sistema girante estaria disponível para tombar a magnetização [18].

2.1.3. Tratamento clássico

Apesar de o spin ser uma grandeza quântica sem analogia clássica e ser o fundamento do fenômeno de NMR, pode-se tratar todos os eventos em um experimento de MR classicamente sem perda de informação, pois além da descrição clássica concordar extremamente bem com a descrição quântica, o sinal adquirido no aparelho de ressonância tem sua origem no eletromagnetismo clássico, não sendo necessário, pelo menos em princípio, sua quantização. É sabido da mecânica clássica que um corpo que precessiona possui momento angular dado por

$$\mathbf{L} = \mathbf{r} \times \mathbf{p},\tag{2.3}$$

cujo vetor pode ser variado se for aplicado um torque ${\bf T}$ dado por

$$\mathbf{T} = \mathbf{r} \times \mathbf{F} = \mathbf{r} \times \frac{d\mathbf{p}}{dt} = \frac{d\mathbf{L}}{dt}.$$
(2.4)

Como o corpo que aqui precessiona possui carga, ele terá também um momento magnético μ que é definido por

$$\boldsymbol{\mu} = IA\hat{\mathbf{n}} \tag{2.5}$$

onde I é a corrente, A é a área delimitada pelo caminho percorrido pela corrente e $\hat{\mathbf{n}}$ é um vetor unitário perpendicular ao plano da área. Para um corpo com carga e rotacionando ao redor de um ponto fixo a uma distância r, com velocidade v, o momento magnético fica

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{ev}{2\pi r} \pi r^2 \hat{\mathbf{n}}.$$
 (2.6)

Usando que L = mvr é possível escrever μ como⁶

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{e}{2m} \mathbf{L} = \gamma \mathbf{L} \tag{2.7}$$

onde γ é a razão giromagnética que apareceu na equação (2.2). A equação 2.7 mostra que o momento magnético aponta na mesma direção do momento angular, com o sentido dependendo do sinal de γ .

⁶Este resultado clássico concorda com o análogo quântico, mas somente para o movimento orbital. Para o spin do elétron, porém, a proporção de μ para L é duas vezes maior do que o movimento orbital, ou seja, $\mu = e L/m$ [19].

Da eletrodinâmica clássica sabe-se que quando um objeto que possui um momento magnético μ é posto em um campo magnético \mathbf{B}_0 ele sofre um torque dado por

$$\mathbf{T} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_{\mathbf{0}}.\tag{2.8}$$

Combinando as equações (2.4), (2.7) e (2.8) obtem-se a equação do movimento para μ

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B_0}.$$
(2.9)

No caso macroscópico, que é o que ocorre na prática, pode-se trocar o momento magnético μ de todas as equações pela magnetização total **M**, desde que sejam adicionados à equação de movimento termos para levar em conta os processos de relaxação.

A dinâmica das três componentes da magnetização \mathbf{M} é descrita através das equações de Bloch [18, 20]

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma [M_y(t)B_0 - M_z(t)B_{1y}] - \frac{M_x(t)}{T_2},$$
(2.10)

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma [M_z(t)B_{1x} - M_x(t)B_0] - \frac{M_y(t)}{T_2},$$
(2.11)

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma [M_x(t)B_{1y} - M_y(t)B_{1x}] - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}, \qquad (2.12)$$

onde M_0 é a magnetização longitudinal inicial, antes do pulso de radiofrequência $\mathbf{B_1} \in T_1 \in T_2^7$ são constantes de tempo associadas aos processos de relaxação longitudinal e transversal, respectivamente.

2.1.4. O processo de relaxação

Após o pulso de RF, a magnetização pode adquirir uma componente transversal⁸. Quando o pulso é desligado, todos os spins (e consequentemente a magnetização transversal) continuam precessionando no plano x-y ao redor do eixo z, como indica a Figura 2.6. Começa, então, o processo de relaxação. A frequência de precessão da magnetização transversal é a mesma dos spins individuais, i.e., a frequência de Larmor, dada pela equação (2.1).

⁷Quando considera-se as inomogeneidades de campo utiliza-se o tempo de relaxação T_2^* , ao invés de T_2^* . ⁸Dependendo do tempo em que este pulso permanece ligado



Figura 2.6.: Adaptada de [17]. Precessão da magnetização transversal (seta em cinza claro) no plano x-y.



Figura 2.7.: Adaptada de [1]. Magnetização M durante a relaxação.

As componentes da magnetização, durante a relaxação, têm a forma descrita pela solução das equações de Bloch, dadas por [18]

$$M_x(t) = e^{-\frac{t}{T_2}} [M_x(0) \cos \omega_0 t + M_y(0) \sin \omega_0 t], \qquad (2.13)$$

$$M_y(t) = e^{-\frac{t}{T_2}} [-M_x(0)\sin\omega_0 t + M_y(0)\cos\omega_0 t], \qquad (2.14)$$

$$M_x(t) = M_z(0)e^{-\frac{t}{T_1}} + M_0[1 - e^{-\frac{t}{T_1}}], \qquad (2.15)$$

onde t = 0 é o tempo no qual o pulso de RF é desligado. Quando $t \to \infty$:

$$M_x(\infty) = M_y(\infty) = 0, \quad M_z(\infty) = M_0.$$
 (2.16)

A Figura 2.7 mostra a trajetória da magnetização M durante o processo de relaxação.

Após a cessação do pulso de RF, como não há mais nenhum campo no plano transversal, a magnetização neste plano começará a desaparecer, pois os spins individuais sentem campos locais diferentes devido ao ambiente térmico em que se encontram, conforme foi descrito na Seção 2.1.2, e por causa disto começam a precessionar com frequências ligeiramente diferentes. Isso faz com que haja uma defasagem entre eles, diminuindo a magnetização transversal até ela desaparecer. Conforme perdem a fase no plano x-y os spins sentem também o campo \mathbf{B}_0 , portanto passam a se realinhar de acordo com sua distribuição inicial, i.e., antes do campo \mathbf{B}_1 ser aplicado. Com isso a magnetização longitudinal retorna também ao seu valor inicial M_0 . Porém, a relaxação transversal é normalmente bem mais rápida que a longitudinal, como pode ser visto através da Figura 2.7.

2.1.5. O sinal de NMR

Embora a magnitude da magnetização transversal após o pulso de RF seja pequena ela é detectável, pois oscila em uma frequência muito bem definida.



Figura 2.8.: Adaptada de [17]. Indução de um sinal de NMR.

Devido à precessão da magnetização (e de acordo com a Lei de Faraday) surge um campo elétrico no espaço, que na presença de um condutor acelera as cargas livres deste último gerando uma corrente elétrica induzida. Essa corrente induzida é oscilante e decai com o tempo, pois é criada de acordo com o comportamento da magnetização transversal (que é o mesmo), e é chamada de *Free Induction Decay* (FID). O processo de indução pode ser visto na Figura 2.8.

Obtem-se espectros em ressonância magnética fazendo uma transformada de Fourier no sinal adquirido (FID). Dessa maneira é mais fácil de retirar informações dos dados, uma vez que a concentração dos metabólitos é proporcional à área sob o pico correspondente [21]. Além disso, a largura à meia-altura do pico é igual a $1/\pi T_2^*$. Como já foi dito, cada spin sente um campo ligeiramente diferente devido ao ambiente em que se encontra e isso é refletido no espectro em diversos picos, um para cada metabólito. Esse efeito, conhecido como *deslocamento químico*, será tratado em mais detalhes na próxima seção.

2.1.6. Deslocamento químico

O campo magnético experimentado por dois núcleos atômicos de uma mesma molécula é diferente se o ambiente eletrônico em que se encontram é diferente. Prótons localizados no grupo $-CH_3$ de determinada molécula, por exemplo, sentem campos magnéticos ligeiramente diferentes dos prótons localizados em grupos $-CH_2$ [17].



Figura 2.9.: Adaptada de [17]. Etapas do deslocamento químico.

O deslocamento químico é um processo predominantemente intramolecular⁹ que possui duas etapas: primeiro o campo magnético externo \mathbf{B}_0 induz correntes nas nuvens eletrônicas das moléculas devido ao paramagnetismo e ao diamagnetismo eletrônico; depois, as correntes moleculares circulantes geram por sua vez um campo magnético, que também será sentido pelo núcleo (Figura 2.9). Portanto, o campo magnético total sentido pelo núcleo será a soma do campo externo e do campo induzido.

Embora o campo induzido seja muito pequeno, por outro lado ele é suficientemente grande para causar deslocamentos mensuráveis nas frequências de precessão dos núcleos e sua magnitude é diretamente proporcional ao campo externo $\mathbf{B_0}$ aplicado. O campo efetivo sentido pelo núcleo é dado por

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_0(1 - \sigma), \tag{2.17}$$

onde σ é uma constante adimensional conhecida como *constante de blindagem*, que depende do ambiente químico do núcleo. A equação 2.1 pode ser generalizada se o campo \mathbf{B}_0 for substituído pelo campo efetivo (2.17). Consequentemente, cada spin nuclear precessiona com frequência ligeiramente diferente devido ao ambiente químico em que se encontra. Essa diferença de frequências faz com que apareça mais de um pico no espectro (Figura 1.1, onde o eixo das abcissas é conhecido como *chemical shift*), o que não ocorreria se a frequência de precessão de todos os núcleos fosse igual, como foi mostrado pela equação (2.1).

Aqui é importante salientar que, como já foi dito, a frequência de precessão depende do campo magnético aplicado, portanto a posição dos picos no espectro também dependerá

⁹Porém possui também significante componente intermolecular, que não será tratada aqui, mas é discutida na Seção 9.1 de [17].

do campo. Em geral, é interessante deixar essas frequências de ressonância presentes no espectro independentes do campo aplicado. Para isso utiliza-se as unidades do espectro em partes por milhão (ppm), onde 1ppm, no caso do espectro de hidrogênio para um campo de $3T^{10}$, representa 128Hz. A fórmula que trasforma unidades de hertz para ppm é a seguinte [1]:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6, \tag{2.18}$$

onde ν é a frequência do componente sob investigação e ν_{ref} é a frequência do componente usado de referência.

2.1.7. Acoplamento J

Além dos vários picos presentes em um espectro correspondentes a determinada molécula, algumas vezes a mesma molécula pode ter seu pico dividido em picos menores, como pode ser visto na Figura 2.10 para o caso do NAA [22].



N-acetylaspartate

Figura 2.10.: Adaptada de [22]. Dubleto-de-dubletos do NAA centrados em 2,49, 2,67 e 4,38ppm correspondentes aos prótons dos grupos CH_2 e CH do radical de aspartato. Outro dubleto aparece em 7,82ppm devido ao grupo amido NH.

Esse efeito no espectro é causado pelo acoplamento J, que é independente do campo externo aplicado e funciona da seguinte maneira. A Figura 2.11 mostra dois conjuntos de spins nucleares com um orbital de ligação contendo dois elétrons pareados, devido ao princípio de exclusão de Pauli. Ambos os conjuntos possuem a mesma energia¹¹. Adicionando-se

 $^{^{10}\}mathrm{Cuja}$ frequência de precessão é 128MHz.

¹¹É interessante lembrar que o momento magnético do núcleo é paralelo à direção de seu spin (pois possui $\gamma > 0$) e o momento magnético do elétron é antiparalelo (pois possui $\gamma < 0$), como pode ser visto por $\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{S}$.



Figura 2.11.: Adaptado de [17]. Conjunto de spins pareados com a mesma energia, devido ao princípio de exclusão de Pauli.



Figura 2.12.: Adaptado de [1]. O contato de Fermi favorece a orientação antiparalela entre os spins nuclear e eletrônico.

agora um spin nuclear, de acordo com o contato de Fermi o estado de menor energia será aquele no qual os spins nuclear e eletrônico estão antiparalelos [23, 24] (Figura 2.12). A orientação do segundo spin nuclear configurará então estados cuja energia total será mais, ou menos, favorável. A Figura 2.13 mostra as quatro configurações possíveis, sendo as mais favoráveis (com menor energia) a segunda e a terceira, que possuem também os dois spins nucleares do conjunto orientados antiparalelamente.

Na formação do espectro, o acoplamento J faz com que surjam subpicos da seguinte forma. A Figura 2.14 mostra uma molécula de 1,1,2 triclorometano, cujos prótons H_a e H_b são acoplados [25]. Considere primeiro o sinal de H_a : além de sentir os elétrons de valência



Figura 2.13.: Adaptada de [1]. Quatro possíveis orientações para dois átomos com elétrons compartilhados. Os estados de menor energia são o segundo e terceiro, onde os spins nucleares estão orientados antiparelelamente com relação aos spins eletrônicos.



Figura 2.14.: Adaptada de [25]. O sinal à direita, correspondente aos dois prótons de H_a , está dividido em dois subpicos e é chamado dubleto. Já o sinal à esquerda, correpondente ao H_b , está dividido em três picos por causa das diferentes orientações possíveis dos núcleos e é chamado tripleto.

próximos, cada um dos próton de H_a é influenciado também pelo campo magnético gerado por H_b e dependendo da orientação do momento magnético, este pode aumentar ou diminuir o campo externo B_0 sentido pelo núcleo H_a . Portanto, considerando as duas orientações possíveis (alinhado ao campo ou contrário ao campo), que possuem probabilidades iguais de ocorrer, metade das moléculas sentirá um campo maior, enquanto a outra metade sentirá um campo menor. Com isso, ao invés de ter somente um sinal de H_a , haverá agora uma subdivisão em dois picos (chamado dubleto) devido às duas variações do campo externo.

O campo sentido por H_b será devido aos dois núcleos de H_a , que serão denominados como H_{a1} e H_{a2} . Aqui há quatro possibilidades de orientação: H_{a1} e H_{a2} alinhados ao campo externo, H_{a1} e H_{a2} contrários ao campo, H_{a1} alinhado e H_{a2} contrário e H_{a1} contrário e H_{a2} alinhado. Os dois primeiros casos originam um pico cada no espectro, enquanto os dois últimos casos contribuem igualmente para a variação do campo externo e formam o terceiro pico no centro.

Existe ainda o caso onde cada pico do dubleto é dividido em dois, o que é chamado de dubleto-de-dubleto. Tal divisão ocorre para o NAA e o NAAG e funciona da seguinte forma. O próton de H_c da Figura 2.15 tem seu sinal dividido em um dubleto devido ao acoplamento com H_a . Cada um dos dois picos desse dubleto é dividido novamente pelo H_b em mais dois dubletos, resultando em dois subpicos. Acoplamentos mais complexos podem ocorrer de acordo com a estrutura da molécula.



Figura 2.15.: Adaptada de [25]. Dubleto-de-dubleto de H_c .

No caso do NAA (Figura 2.10) o radical CH possuiu um dubleto-de-dubleto em 4,38ppm devido ao acoplamento com os hidrogênios do radical CH_2 . Cada um destes hidrogênios, por sua vez, está acoplado com o outro hidrogênio deste radical CH_2 e também com o hidrogênio do radical CH. Isso resulta em dubleto-de-dubletos para cada um dos hidrogênios do CH_2 , com os picos em 2,49 e 2,67ppm [22]. O acoplamento dos hidrogênios para o NAAG ocorre de maneira semelhante.

2.2. Gradientes de campo e Sequências de Pulso

2.2.1. Gradientes de campo

O terceiro tipo de campo magnético utilizado em aparelhos de ressonância magnética são os gradientes de campo. Como o próprio nome diz, estes servem para mudar a intensidade do campo \mathbf{B}_0 , cuja direção normalmente é tomada ao longo do eixo z. Existem gradientes de campo nas três direções espaciais, porém esses gradientes mudam somente a intensidade do campo em z, e não criam campos nas outras duas direções. Os gradientes são utilizados para mudar a intensidade do campo magnético presente em determinada região do espaço, de acordo com

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{G} \cdot \mathbf{r},\tag{2.19}$$

de forma que os núcleos presentes nessa região sentirão este campo específico. Selecionandose a faixa do pulso de radiofrequência para o valor correspondente a esse novo campo, pode-se levar para o plano transversal somente os spins que precessionam com essa nova frequência. Com isso seleciona-se somente a região do espaço que é de interesse ao estudo (Figura 2.16).



Figura 2.16.: Adaptada de http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/. Na primeira imagem (à esquerda) há uma fatia com os spins precessionando com mesma frequência, devido ao campo \mathbf{B}_0 . Essa fatia foi selecionada com a aplicação de um primeiro gradiente, não mostrado. Com a aplicação do segundo gradiente (G_{ϕ}) muda-se a intensidade na direção horizontal, portanto agora existem três faixas com três spins precessionando na mesma frequência (imagem do meio). Por fim, o terceiro gradiente é aplicado (G_f) mudando a intensidade do campo no eixo vertical. Devido a essa mudança, cada um dos nove spins possui uma combinação única de fase e frequência de precessão (imagem à direita). Com a combinação destes três gradientes é possível selecionar uma área específica do cérebro, por exemplo, de forma a adquirir o sinal somente desta área (como será visto na próxima seção).

2.2.2. Sequência PRESS

A sequência PRESS (*Point Resolved Spectroscopy*) (Figura 2.17) consiste da aplicação de um pulso de 90° seguido por dois de 180°. Cada gradiente de campo é aplicado com um dos pulsos, de forma que somente os núcleos localizados na interseção dos três pulsos contribuirão com o sinal [26].

2.2.3. Sequência MEGA-PRESS

A sequência MEGA-PRESS é uma adaptação da sequência PRESS e pode ser usada para separar o pico de NAA do pico de NAAG. Ela é semelhante à sequência PRESS, mas com dois pulsos de 180° seletivos (180 $_s^\circ$ na Figura 2.18) a mais usados para perder a coerência de fase do sinal do metabólito que se deseja suprimir. Além dos gradientes



Figura 2.17.: Adaptada de [26]. Sequência PRESS. O pulso CHESS é usado para suprimir o sinal da água.

de seleção, que estavam presentes na sequência PRESS, são usados também gradientes de defasagem e refasagem ao redor dos pulsos seletivos e do segundo pulso de 180° (gradientes $G_1, G_2 \in G_3$ na Figura 2.18). Esses gradientes ajudam a refasear o sinal a ser adquirido e a causar perda de coerência de fase no sinal do metabólito que se quer suprimir [27].



Figura 2.18.: Adaptada de [27]. Sequência MEGA-PRESS.

Na prática, a sequência MEGA-PRESS consiste basicamente da aplicação de dois pulsos de edição de forma intercalada (i.e., um para *scans*/espectros ímpares e outro para *scans*/espectros pares). Um pulso é aplicado no pico de ressonância de interesse e o outro pode ser aplicado, em princípio, em qualquer outra região do espectro (onde, geralmente, não haja picos). Dessa forma, a subtração dos espectros ímpares dos pares resulta na anulação de todos os picos do espectro, com exceção do referente à ressonância de interesse.

2.3. N-acetil-aspartato e N-acetil-aspartil-glutamato

O NAA é sintetizado na mitocôndria do neurônio a partir de aspartato e da coenzima acetil A (AcCoA) [2]. A porção acetato da AcCoA, por sua vez, é derivada predominantemente do metabolismo energético mitocondrial de glicose (Glc) [28]. O NAA não pode ser catabolizado pelos neurônios e para isso é transportado para o oligodendrócito [29], onde o acetato é removido do NAA através da enzima ASPA (aspartoacilase). O acetato por sua vez é transformado novamente em AcCoA, que é uma precursora para a síntese de lipídios [30], e o aspartato, liberado no fluido extracelular, retorna aos neurônios onde é usado para formar novamente NAA [29].

O NAAG também é sintetizado majoritariamente em neurônios, sendo que as evidências apontam principalmente para a síntese de NAAG a partir de NAA e glutamato (Glu), e não como um produto da quebra de um peptídeo maior [2]. Depois de sintetizado, o NAAG é primeiro transportado para os astrócitos, onde é hidrolisado através da enzima NAAG-peptidase. O Glu liberado é transformado em Gln, que é transportada de volta para os neurônios. O NAA residual vai para os oligodendrócitos onde ocorre o ciclo descrito no parágrafo acima [29]. Segundo Baslow e Guilfoyle [28], a síntese de NAAG a partir de NAA e Glu implica em uma via metabólica única Glc-NAA-NAAG, que é uma função da taxa de oxidação da glicose. Por sua vez, isso implicaria que as taxas de síntese de NAA e NAAG fornecem uma indicação da taxa de consumo de glicose pelo neurônio e, portanto, devem conter informações sobre o nível de atividade neuronal. Isso poderia auxiliar na localização dos eventos no cérebro que resultam numa variação da demanda energética neuronal [28].

Uma hipótese levantada sobre a principal função do NAA no sistema nervoso é que este funcionaria como uma bomba molecular, enviando para o meio extracelular a água criada no neurônio resultante do metabolismo energético devido à ativação neuronal [12]. No entanto, ainda não foi caracterizada nenhuma proteína que atuaria para transportar NAA e água para fora dos neurônios [2]. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de propagação que regulam especificamente a liberação de NAA dos neurônios. Portanto, pelo que se sabe até o momento, o NAA não apresenta as características necessárias para a função de bomba de água [2].

Outra função atribuída ao NAA é o fato de ser uma fonte de acetato para a síntese de lipídios de mielina nos oligodendrócitos [30]. Além disso, é certo que o NAA está associado ao metabolismo energético neuronal, sendo que vários experimentos nos quais este metabolismo foi comprometido intencionalmente ou por doença mostraram decréscimo nos níveis deste metabólito [2].

O NAAG, por sua vez, é liberado nas sinapses e atua como modulador da liberação de neurotransmissores como o glutamato, GABA e dopamina, entre outros [30], tendo sido apontado como relacionado à resposta hiperêmica vascular responsável pelo sinal BOLD [7]. Este último aspecto foi observado em um experimento com ratos anestesiados nos quais se injetou um inibidor da NAAG-peptidase, enzima responsável pela hidrólise do NAAG. Nesses ratos, verificou-se um aumento inicial do sinal BOLD em relação aos níveis basais, seguido por um decréscimo em relação a esses níveis, que persistiu por aproximadamente 33 minutos [7]. Este efeito foi explicado como uma ligação do efluxo de NAAG dos neurônios e sua hidrólise nos astrócitos com as respostas hiperêmicas de oxigenação no cérebro [7].

2.4. Experimentos anteriores

Existem poucos trabalhos na literatura que apresentam estudos sobre variações de NAA e NAAG através de espectroscopia funcional por ressonância magnética (fMRS). De fato, tem-se conhecimento de apenas dois artigos que mostraram resultados significativos para a variação do NAA [12], [13], os quais se aproximam dos resultados obtidos pelo grupo de Castellano [11]. Os três trabalhos serão tratados nesta seção juntamente com um quarto artigo [14], que não obteve alterações expressivas no nível de NAA associadas à estimulação cerebral, mas apenas nos níveis de outros metabólitos, gerando uma discussão ainda inconclusiva sobre eventuais variações de NAA em experimentos dessa natureza¹². E importante salientar que, na verdade, o sinal de NAA ao qual os trabalhos de Baslow et al. [12] e Sarchielli et al. [13] se referem é a combinação dos sinais de NAA e NAAG (NAA+NAAG), uma vez que os espectros destes metabólitos possuem uma grande sobreposição, principalmente no pico situado em 2ppm. Apenas no experimento de Castellano et al. foi analisada a variação do sinal de cada metabólito separadamente [11]. No artigo de Mangia et al. [14], em princípio, estes sinais poderiam ter sido separados, já que usaram o mesmo método de análise utilizado em [11]; no entanto, isso não está especificado no trabalho deles. Com base em algumas das figuras mostradas no artigo [14], assume-se que, ao mencionar o NAA, Mangia *et al.* estão se referindo, de fato, ao sinal de NAA+NAAG.

¹²Recentemente foi publicado um trabalho no qual variações de NAA e NAAG durante estímulo visual também não foram encontradas [31], concordando com [14].

2.4.1. Características dos experimentos

	Sarchielli [13]	Castellano [11]	Baslow [12]	Mangia [14]
Campo Magnético (T)	1,5	3	3	7
	Bobina de	Bobina de	Bobinas de	Bobina de
Bobina	cabeça volumétrica	cabeça volumétrica	superfície e de	superfície
	(padrão)	de 8 canais	volume	
Sequência de Pulsos	PRESS	PRESS	PRESS	STEAM
TR: Tempo de Repetição (ms)	2000	2000	2000	5000
TE: Tempo ao Eco (ms)	135	288	144	6
NSA	64	8	$15~\mathrm{e}~100$	1

Tabela 2.1.: Principais parâmetros dos experimentos aqui comparados. Cada um deles é referido pelo nome do primeiro autor.

Os quatro experimentos possuem semelhanças e diferenças no que diz respeito aos protocolos de aquisição, paradigmas e pré-processamento. Os principais parâmetros desses experimentos estão reunidos na Tabela 2.1. Como se vê pela tabela, a sequência de pulsos mais utilizada foi a sequência PRESS; somente em [14] utilizou-se a sequência STEAM (*Stimulated Echo Acquisition Mode*)¹³, com um tempo de mistura (TM) de 32ms. O NSA (*Number of Spectral Averages*) variou em todos os experimentos: 64 para Sarchielli *et al.* [13], em Baslow *et al.* foi utilizado NSA=15 para a bobina de superfície e NSA=100 para a bobina de cabeça [12], para Mangia *et al.* NSA=1 [14], ao passo que Castellano *et al.* usou NSA=8 e 8 phase cyclings [11]. Todos os experimentos contaram com a participação de voluntários saudáveis, sendo que no trabalho de Sarchielli *et al.* [13] foram estudados também pacientes com enxaqueca. Neste último estudo, houve 22 pacientes com enxaqueca com aura e 22 pacientes com enxaqueca sem aura, além de 10 indivíduos saudáveis. Participaram da pesquisa de Castellano *et al.* 16 indivíduos controles [11], em contraste com Baslow *et al.* [12], que utilizaram apenas 6, enquanto que no trabalho de Mangia *et al.* [14] houve 12 controles.

O protocolo experimental utilizado foi semelhante nos quatro trabalhos: estímulo visual composto por um padrão xadrez radial piscando com uma frequência de 8Hz (Figura 2.19), com exceção do experimento de Sarchielli *et al.* [13], que usou estímulo visual por meio de *goggles* piscando uma luz vermelha, também na frequência de 8Hz. Utilizou-se um VOI (*volume of interest*) de $2 \times 2 \times 2 \ cm^3$ em [11] e [12], e $2 \times 2, 2 \times 2 \ cm^3$ em [14]; em [13]

¹³Uma descrição desta sequência pode ser encontrada em [26].



Figura 2.19.: Estímulo visual usado nos experimentos de Castellano *et al.* [11], Baslow *et al.* [12] e Mangia *et al.* [14].

não está mencionado o tamanho do voxel usado. Em todos os experimentos este voxel foi posicionado no córtex visual, de modo a cobrir da melhor forma possível a área ativada, detectada previamente através de um experimento de fMRI. Em [11] e [14] o voxel foi posicionado no hemisfério direito, em [12] no hemisfério esquerdo, e em [13] foi posicionado centralmente entre os dois hemisférios.



Figura 2.20.: Paradigma usado no experimento de Sarchielli et al. [13].

O número e a duração dos blocos dos paradigmas também variaram entre os experimentos. As diferenças entre os paradigmas das quatro equipes podem ser visualizadas através das Figuras 2.20 a 2.23. Sarchielli *et al.* [13] usaram três blocos com diferentes durações: 3,7min para o primeiro bloco, que era de repouso (*off*), 25,7min para o segundo bloco, de estímulo (*on*), e 7,4min para o terceiro bloco (também de repouso, *off*) (Figura 2.20). No experimento de Baslow *et al.* [12] houve quatro paradigmas, onde variou-se a duração do bloco inicial de repouso (10min a 30min), seguido por um bloco de estímulo de 10min; o último paradigma teve, após este bloco *on*, um bloco *off* e mais um bloco *on*, todos com 10min de duração (Figura 2.21). Mangia *et al.* [14] fizeram dois protocolos de testes, um com o bloco *off* inicial de 2,7min seguido de quatro períodos de 5,3min alternados, *on-off-on-off*, e outro, mais longo, com o mesmo bloco inicial seguido por um bloco *on* de 10,6min e um *off* de 10,6min (Figura 2.22). Castellano *et al.* [11] utilizou um bloco inicial de repouso de 5,3min, seguido por um bloco *off* de 10,7min [11] (Figura 2.23). Pode-se notar que para todos os casos, com exceção do paradigma 1 usado



Figura 2.21.: Paradigmas usados no experimento de Baslow et al. [12].



Figura 2.22.: Paradigmas usados no experimento de Mangia et al. [14].



Figura 2.23.: Paradigma usado no experimento de Castellano et al. [11].

por Mangia et al. [14], a duração do bloco de estímulo foi da ordem de 10 minutos.

Após a aquisição dos espectros e antes de serem quantificados, foi realizado um pré-processamento, visando fazer algumas correções e/ou operações nos dados a fim de melhorar a qualidade dos sinais. Sarchielli et al. [13] fizeram correção de correntes induzidas e de linha de base, e apodização com um filtro gaussiano-lorentziano com frequências de (4Hz, 4Hz). No artigo de Mangia et al. [14] são mencionadas as seguintes etapas de pré-processamento: correção de frequência e fase dos scans individuais, soma de 32 scans, correção de correntes parasitas residuais, apodização com um filtro gaussiano de frequência 12Hz, e correção de fase de ordem zero. Nas aquisições de Castellano *et al.* [11] foram corrigidas a fase e a frequência dos espectros, e eliminados os dois últimos espectros do bloco inicial, juntamente com os dois primeiros e dois últimos espectros dos blocos seguintes. Esta etapa foi necessária para evitar contaminação entre blocos devido ao descompasso entre o gerador de estímulos e o equipamento de MR [11]. Para a análise (quantificação) dos espectros resultantes, Sarchielli et al. [13] fizeram um ajuste Marquard-Levenberg no domínio da frequência. Já Baslow et al. [12] calcularam a área sob o pico de NAA (embora não especificado, supostamente os autores se referem ao pico em 2ppm), enquanto que no trabalho [11] e em [14] foi usado o método LCModel [8], que não requer nenhuma intervenção externa prévia por parte do usuário.

2.4.2. Resultados e discussões dos experimentos anteriores

Aparentemente, os resultados obtidos foram semelhantes para três dos trabalhos aqui discutidos, embora este fato mereça um comentário mais detalhado que será feito adiante. Sarchielli *et al.* [13] encontraram diminuições na concentração de NAA durante a estimulação visual para os três grupos de voluntários, sendo que para os pacientes com enxaqueca com aura esta variação foi mais acentuada (-14%)[13]. Isto levou os autores a sugerir que existe uma menor eficiência nas funções mitocondriais para esses pacientes, uma vez que o NAA é um indicador da integridade funcional do metabolismo mitocondrial neuronal [30]. O grupo de Baslow [12] encontrou um decréscimo similar para o NAA no final do estímulo (-13,1%) e explicou este decréscimo através da sua hipótese, citada anteriormente, de que o NAA funciona como uma bomba molecular de água. Este resultado, no entanto, foi contestado por Mangia *et al.* [32], uma vez que sua equipe não encontrou variações significativas para o NAA, apenas para outros metabólitos (lactato, glutamato, glicose e aspartato), em condições de pesquisa semelhantes às de Baslow *et al.* [12] no que diz respeito ao paradigma e ao estímulo. Apesar de haver algumas diferenças entre os dois trabalhos (como a intensidade do campo utilizado), o grupo de Mangia assegura que a divergência entre os resultados não deveria existir [32]. Baslow et al. contra-argumentaram [33] dizendo que a forma como Mangia et al. [14] realizaram as médias dos espectros não possibilitaria encontrar uma variação maior do que 2% na concentração de NAA. Além disso, de acordo com a resposta de Baslow et al. [33], o grupo de Mangia tomou como pressuposto que o sinal do NAA permaneceu estável (ao invés de considerarem isto uma hipótese a ser verificada) e apresentaram dados combinados para os paradigmas curto e longo [14], de forma que apenas o paradigma longo seria comparável aos resultados de Baslow et al. [12]. Castellano et al. [11] obtiveram para o NAA um decréscimo de cerca de 20% e um aumento de 200% para o NAAG durante a estimulação visual; já para o conjunto NAA+NAAG, a variação foi muito pequena ($\pm 2\%$). Tais variações se enquadraram em modelos para o metabolismo energético subjacente à ativação neuronal que apontam o NAAG como o responsável pela resposta hiperêmica vascular que origina o sinal BOLD [7, 28]. Também concordaram com o fato de que o NAAG e o NAA estão presentes no cérebro em uma proporção de 1:10, e que a síntese do NAAG é feita a partir do NAA e do glutamato [28]. Quando se comparam os resultados de Castellano et al. [11] com os dos demais, temos dois possíveis cenários. Por um lado, os resultados aparentemente concordam com os de Baslow et al. [12] e Sarchielli et al. [13], já que ambos reportaram diminuições no pico de NAA associadas ao estímulo, o que corresponde qualitativamente ao apresentado em [11] para este metabólito. Cabe lembrar, no entanto, que ambos os trabalhos mediram efetivamente a variação conjunta de NAA+NAAG, enquanto que a análise em [11] permitiu separar as contribuições desses metabólitos. Por outro lado, se assumirmos que os resultados reportados por Mangia et al. [14] também se referem à soma NAA+NAAG, então os resultados de Castellano *et al.* [11] conjugados para esses metabólitos estão em concordância com os deles.

B Experimentos Realizados

Como os trabalhos existentes referentes à variação de NAA e NAAG (discutidos no capítulo anterior) levaram a uma discussão até o momento inconclusiva, a ideia deste projeto foi realizar um experimento que pudesse melhorar o entendimento existente sobre o assunto. Para isso pensou-se em utilizar um paradigma o mais similar possível aos experimentos anteriores (ao menos, em termos de duração e tipo do estímulo), mas com uma sequência de pulsos que pudesse separar as contribuições do NAA e NAAG; neste caso, a MEGA-PRESS.

3.1. Parâmetros de aquisição

Os dados foram adquiridos com um sistema de MR de 3T (*Achieva, Philips, The Netherlands*) com uma bobina de cabeça volumétrica de 8 canais. Para a aquisição foi utilizada a sequência MEGA-PRESS, com tempo de repetição (TR) = 2000ms, tempo ao eco (TE) = 140ms, largura espectral de 2kHz, 2048 pontos e tamanho do voxel $3 \times 3 \times 2cm^3$. Um exemplo de espectro real adquirido no experimento está mostrado na Figura 3.1.

A ressonância de interesse da sequência MEGA-PRESS foi localizada em 4,38ppm, correspondente ao pico de NAA e 4,61ppm para obter o espectro de NAAG (o segundo pulso



Figura 3.1.: Exemplo de espectro adquirido no experimento de fMRS.



Figura 3.2.: Adaptada de [15]. Ressonâncias de interesse utilizadas na sequência MEGA-PRESS, para o experimento de NAA (direita) e NAAG (esquerda).

de edição foi aplicado em 4,84ppm e 4,15ppm para o NAA e NAAG, respectivamente)(Figura 3.2). Embora não seja possível ver o efeito do pulso de saturação nessa região devido ao pico da água, existem outros picos de NAA e NAAG em torno de 2,5ppm que estão acoplados àqueles na região de 4,5ppm. Consequentemente, o resultado do experimento é visto nos picos em \sim 2,5ppm.



Figura 3.3.: Paradigma utilizado.

3.2. Paradigma e Estímulo

O protocolo experimental consistiu de 1 bloco de repouso/baseline (320s, 20 espectros) seguido de 1 bloco de estímulo (640s, 40 espectros) e 1 bloco de repouso (640s, 40 espectros) (Figura 3.3, paradigma igual ao utilizado em [11]). O estímulo visual foi composto por um padrão xadrez radial piscando com uma frequência de 8Hz (Figura 3.4) programado usando o software E-Prime (Psychology Software Tools, USA, http://www.pstnet.com/) e mostrado aos sujeitos em um monitor dentro do aparelho de MR usando o sistema Eloquence (InVivo, USA, http://www.invivocorp.com/fmri/eloquence.php). Antes da aquisição de fMRS, foram adquiridas imagens anatômicas ponderadas por T_2 , seguido por um protocolo de fMRI com o mesmo estímulo visual usado no experimento fMRS. O mapa de ativação foi sobreposto nas imagens T_2 e o voxel de MRS posicionado no lobo occipital direito sobre a área ativada (Figura 3.5). O protocolo foi rodado duas vezes, em dias diferentes, para obter o espectro de NAA (subtraindo o NAAG) e vice-versa.



Figura 3.4.: Estímulo visual utilizado.



Figura 3.5.: Posicionamento do voxel de MRS.

3.3. Sujeitos

Vinte voluntários saudáveis (idade-média 27 ± 6 , faixa-etária 20-40, 40% mulheres) participaram do estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP e todos os sujeitos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido¹.

 $^{^1\}mathrm{Ap\hat{e}ndice}$ A

4

Análise dos Dados e Resultados

A seguir serão apresentadas as análises dos dados. Cada sujeito foi numerado de 1 à 20, sendo esta numeração mantida em todas as análises. Os dados do Sujeito 1, no experimento do NAA, e do Sujeito 7, no experimento do NAAG, foram adquiridos duas vezes e nos dois casos foi colocada a segunda aquisição como sendo o Sujeito 21. Ao longo das análises a comparação entre as duas aquisições para os dois experimentos serão mostradas. Os sujeitos foram agrupados de acordo com o aumento ou diminuição de NAA e NAAG apresentado durante o estímulo; tais variações foram categorizadas separadamente para o NAA e para o NAAG da seguinte maneira. Para o NAA o grupo no qual os sujeitos apresentaram diminuição do metabólito durante o estímulo foi chamado de Grupo 1, enquanto que o grupo no qual os sujeitos não apresentaram este padrão durante o estímulo foi chamado de Grupo 2. Para o NAAG, no Grupo 1 estão os sujeitos que apresentaram aumento deste metabólito durante o estímulo, e no Grupo 2 estão os sujeitos que não apresentaram este padrão durante o mesmo.

Diversas análises foram feitas e agrupadas em duas seções, correspondentes aos dois procedimentos utilizados. A diferença principal entre estes procedimentos é a maneira na qual os espectros foram agrupados para resultar nos espectros finais analisados. Os resultados obtidos a partir da Seção 4.1.3 (seção a partir da qual houve uma padronização dos procedimentos, com os sujeitos analisados separadamente) foram também testados estatisticamente, com o intuito de saber se o resultado como um todo é estatisticamente significante, i.e., se podemos dizer que os resultados dos sujeitos agrupados seguem um padrão, com determinado nível de confiança, ou se não temos condições para afirmar isso. Sendo assim, todos os testes foram feitos comparando-se as variações percentuais obtidas de todos os sujeitos, correpondentes ao bloco de estímulo e ao bloco de repouso subsequente, com os valores correpondentes ao bloco de baseline. Primeiro testou-se se os resultados poderiam ser considerados como uma distribuição normal e, em caso afirmativo, foi usado o teste t de Student¹ ou, em caso contrário, foi usado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Mesmo nos casos em que os resultados puderam ser considerados como uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon para confirmar o teste t. O nível de significância usado para todos os testes foi $\alpha = 0.05$. Para o teste de normalidade foi escolhido o teste de Shapiro-Wilk², cujo valor p > 0.05 indica que é possível considerar que os resultados seguem uma distribuição normal. Para o conjunto de valores correpondentes aos blocos de estímulo ou de repouso que apresentaram este nível de confiança, foi utilizado o teste tde Student pareado e bicaudal. O teste é pareado porque os dados comparados são dos mesmos sujeitos mas em situações diferentes (estímulo e repouso após o bloco de baseline), e é bicaudal porque se deseja saber a significância considerando os valores que diferem do valor que se quer comparar³. Para os dados que não apresentaram o nível de confiança requerido pelo teste de normalidade, foi usado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, que também é pareado e bicaudal. Foram considerados como significantes os resultados com p < 0.05. Todos os testes foram feitos usando o programa Systat.

¹Esse teste paramétrico foi escolhido porque o número de sujeitos (nossa amostra) em nosso estudo é menor que 30, portanto é o teste adequado [34].

 $^{^{2}}$ A robustez deste teste comparado com outros é apresentado em [35].

³O valor a ser comparado é o valor percentual do primeiro bloco do paradigma (*baseline*), que será tomado como zero, pois os valores absolutos obtidos correpondentes aos diferentes blocos do paradigma serão comparados percentualmente com este primeiro.

4.1. Primeiro conjunto de resultados

4.1.1. Padronização do pré-processamento

Antes de analisar os dados foi estabelecida uma padronização das etapas de préprocessamento dos mesmos, visando saber quais métodos eram mais adequados e eficientes para em seguida poder quantificá-los. Em um estudo piloto com oito sujeitos (idade-média de 29 ± 7 anos, faixa-etária 21-40, 63% mulheres) foi feita a correção de fase e de frequência para os espectros medidos, utilizando o MATLAB. Os dois últimos espectros do bloco inicial, juntamente com os dois primeiros e dois últimos espectros dos blocos seguintes foram eliminados devido a um descompasso existente entre o sistema *Eloquence* e o sistema de RM. Os espectros de cada sujeito foram, então, somados de dois em dois para se visualizar se o pico de NAA+NAAG em 2ppm foi anulado conforme previsto, uma vez que este é o resultado esperado quando utiliza-se a sequência MEGA-PRESS, restando apenas um pico de NAA ou NAAG em \sim 2,5ppm. Em seguida, os espectros foram somados de nove em nove, resultando em cinco espectros para cada aquisição (i.e., cada sujeito). Depois, a frequência do pico em torno de 2,5ppm foi corrigida entre os sujeitos e por fim somou-se os espectros correspondentes dos oito sujeitos, obtendo-se cinco espectros resultantes. Estes foram quantificados com o método AMARES (http://www.mrui.uab.es/mrui/) [36].

Para a etapa de correção de fase testou-se dois tipos de correções de ordem zero, ambas realizadas automaticamente por meio de rotinas no MATLAB: uma baseada no primeiro ponto do FID e outra usando como base o pico do NAA. As duas abordagens não atenderam às expectativas, uma vez que o pico de NAA residual em 2ppm ficou maior do que se não fosse feita esta etapa, tanto para o NAA quanto para o NAAG (Figura 4.1); portanto ela não foi aplicada posteriormente. A correção de frequência consistiu também de duas tentativas: primeiro, corrigiu-se a frequência de todos os espectros com relação ao primeiro, para cada sujeito; porém, quando os espectros foram somados de dois em dois, vários espectros resultantes tiveram o pico residual do NAA em 2ppm bem presente. Como alternativa, corrigiu-se primeiro os espectros ímpares e depois a mesma correção foi aplicada aos pares. Este resultado melhorou bastante o alinhamento dos espectros, sendo o utilizado posteriormente (Figura 4.2). A soma dos espectros de diferentes sujeitos teve a finalidade de aumentar a relação sinal-ruído do espectro final e tentar reduzir o erro nas quantificações dos metabólitos. Com este procedimento o pico residual em 2ppm para o NAA praticamente desapareceu, porém para o NAAG este pico residual também



Figura 4.1.: a) Espectros finais após correção de fase do pico de NAA para um sujeito (experimento de NAA) - notam-se os picos residuais bem visíveis em 2ppm. b) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de NAA) – neste caso não há picos residuais em 2ppm, como esperado. c) Espectros finais após correção de fase do pico de NAA para um sujeito (experimento de NAAG) – novamente veem-se os picos residuais em 2ppm. d) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de NAAG) – novamente veem-se os picos residuais em 2ppm. d) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de NAAG) – novamente veem-se os picos residuais em 2ppm. d) Espectros finais do mesmo sujeito sem correção de fase (experimento de NAAG) – não há picos residuais em 2ppm.

aumentou, ficando aproximadamente da mesma altura do pico de interesse de NAAG em torno de 2,5ppm. Por fim, a quantificação com o AMARES resultou em um erro muito grande, não permitindo chegar a uma conclusão sobre possíveis variações da concentração dos metabólitos associadas ao estímulo. O erro foi grande porque o AMARES utiliza formas de linha gaussianas ou lorentzianas para ajustar os pontos do espectro, enquanto que os picos de NAA e NAAG em ~2,5ppm resultantes da sequência MEGA-PRESS não seguem essas formas padrões.

4.1.2. Análise através da média de todos os sujeitos

Com o resultado do estudo piloto se notou que a correção de frequência aplicada primeiro aos espectros ímpares e depois aos pares apresentou o efeito desejado, já a correção de fase não atendeu às expectativas, nem a quantificação com o método AMARES. A correção de fase passou, então, a ser feita manualmente através do jMRUI, e a quantificação do NAA foi feita por meio da área sob o pico deste metabólito em 2,5ppm para cada um dos cinco espectros resultantes, utilizando uma rotina no MATLAB. Assim como na primeira tentativa de quantificação, desta vez também somou-se os espectros de todos os sujeitos



Figura 4.2.: Exemplo de espectros sem a frequência corrigida (acima) e com a frequência corrigida (abaixo).

coletados até o momento (Sujeitos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18 e 19^4) antes de quantificá-los.

O resultado encontrado foi que o NAA diminuiu com o estímulo e continuou diminuindo após o término deste (Figura 4.3); porém, este resultado não representa fielmente a variação da concentração do NAA, uma vez que mostra a variação para a soma de todos os sujeitos. Isso poderia causar discrepância com relação aos resultados obtidos individualmente (ou seja, para cada sujeito), além de não ser um método confiável para indicar se realmente houve a diminuição do metabólito.

⁴Como a numeração foi feita *a posteriori*, pela ordem alfabética dos nomes, os dados dos Sujeitos 3, 13, 14, 15 e 20 ainda não haviam sido coletados.



Figura 4.3.: Porcentagem de variação do NAA para a soma de 15 sujeitos.

4.1.3. Primeira análise através da área sob o pico

Quando analisados individualmente, os dados dos sujeitos apresentaram uma variação de NAA que seguiu um padrão parecido com a Figura 4.3, porém com algumas diferenças significativas, dependendo do caso. Todas as etapas de processamento usadas na antiga análise foram mantidas, apenas com a inserção de uma apodização de 3Hz para todos os espectros (o que diminui o ruído destes) e com a melhoria na qualidade da correção de fase manual. As etapas foram, então, as seguintes para cada um dos vinte sujeitos (idade média 27 ± 6 , faixa-etária 20-40 anos, oito mulheres):

- exclusão dos dois últimos espectros do bloco de *baseline* e dos dois primeiros e dois últimos espectros dos blocos de estímulo e repouso;
- apodização de 3Hz;
- correção de frequência (primeiro dos espectros ímpares e depois a mesma correção aplicada aos pares);
- correção de fase (feita levando-se em consideração o pico de NAA+NAAG em 2ppm, para os espectros ímpares e pares);
- subtração dos espectros ímpares dos respectivos pares;
- soma dos espetros de nove em nove, obtendo-se cinco espectros resultantes (para os cinco pontos temporais) para cada um dos vinte sujeitos.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram um exemplo de espectro ímpar e par, respectivamente para o caso do experimento de NAA e as Figuras 4.6 e 4.7 apresentam um exemplo de


Figura 4.4.: Exemplo de espectro ímpar, com o pico de NAA em torno de 2,5ppm (figura ampliada abaixo) não suprimido.



Figura 4.5.: Exemplo de espectro par, com o pico de NAA em torno de 2,5ppm suprimido (figura ampliada abaixo).



Figura 4.6.: Exemplo de espectro para o experimento de NAA, após todas as estapas de préprocessamento. O pico de NAA está em torno de 2,5ppm, como mostra a figura ampliada abaixo. O pico em torno de 4,8ppm é o pico residual da água.



Figura 4.7.: Exemplo de espectro para o experimento de NAAG, após todas as estapas de préprocessamento. O pico de NAAG está em torno de 2,5ppm, como mostra a figura ampliada abaixo. O pico em torno de 4,8ppm é o pico residual da água.



Figura 4.8.: Variação percentual para 18 sujeitos que seguiram padrão semelhante de diminuição de NAA durante o estímulo.

espectro para os experimentos de NAA e NAAG, respectivamente, após todas as etapas de pré-processamento descritas acima.

O NAA foi quantificado novamente calculando-se a área sob o pico em $\sim 2,5$ ppm para cada espectro de cada sujeito. Os limites usados como início e final do pico de NAA para este cálculo (assim como para o da Seção 4.1.2), contudo, não foram exatamente corretos, pois a região escolhida que contém o pico foi menor do que ela realmente era, dando dessa forma resultados não confiáveis. De qualquer maneira, eles serão mostrados a seguir.

Dezoito sujeitos apresentaram um padrão similar de variação do NAA durante a aquisição (Figura 4.8). Para estes, o NAA diminuiu com o estímulo (entre -2% e -201%) e aumentou após a cessação do mesmo, retornando (ou mostrando uma tendência a retornar) aos níveis do bloco de repouso na maioria dos casos. Os dois sujeitos restantes apresentaram padrões de variação com aumento de NAA durante o estímulo (entre 7% e 34%, Figura 4.9).

A relação sinal-ruído (do inglês *signal-to-noise ratio* – SNR) para cada um dos cinco espectros de cada sujeito foi calculada dividindo-se a altura do pico de NAA pelo desvio padrão do ruído numa região do espectro sem picos (ou seja, pelo desvio padrão dos duzentos primeiros pontos do lado esquerdo do espectro). Obteve-se uma SNR maior que 11 para todos os espectros dos 20 sujeitos. De acordo com os testes estatísticos realizados, os resultados obtidos são significantes.



Figura 4.9.: Variação percentual do NAA para os 2 sujeitos restantes.

4.1.4. Análise através da altura do pico – Primeira linha de base

Nesta quantificação, todas as etapas de processamento usadas na análise anterior foram mantidas, mas agora com um ajuste mais fino na correção de fase, de forma que os espectros ficassem com a maior semelhança possível aos mostrados em Edden *et al.* [15] (Figura 4.10). Para calcular as variações de NAA e NAAG, determinou-se a altura do pico de NAA (ou NAAG), ao invés de calcular a área sob o pico, como tinha sido feito até agora. Essa escolha foi tomada porque a altura do pico é mais estável que a integral sob o pico, ou seja, é mais reprodutível⁵.

Outra medida que ainda não tinha sido levada em conta foi a estimativa de uma linha de base de referência para os espectros, a ser considerada no momento da quantificação, pois nem sempre os espectros seguem uma linha aproximadamente paralela ao eixo horizontal. Este fato ocorre devido à sobra do pico da água resultante da supressão parcial da mesma devido aos pulsos da sequência MEGA-PRESS nessa região. Para calcular essa linha de referência foi feita a média entre os 10 pontos no início e no final do pico em torno de 2,5ppm, para o NAA e para o NAAG, então traçou-se uma reta que passasse pelos dois pontos médios (Figura 4.11) e seu valor correspondente foi subtraído da altura encontrada para o

⁵Tais testes de reprodutibilidade foram realizados por Richard Edden, da Universidade de John Hopkins, que apresentou primeiramente em [15] a separação dos picos de NAA e NAAG em experimento "estático" usando a sequência MEGA-PRESS, e que foi colaborador neste trabalho. A sugestão sobre o cálculo da altura foi dada por ele.



Figura 4.10.: Acima, espectros tomados como exemplo [15]; abaixo, espectros finais para um sujeito, faseados de forma a ficarem o mais parecido possível com o exemplo.

NAA

NAAG



Figura 4.11.: Linha de base estimada para espectros de NAA e NAAG.



Figura 4.12.: Variação percentual para 17 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de diminuição do NAA durante o estímulo. Altura do pico – Primeira linha de base.



Figura 4.13.: Variação percentual do NAA para os 3 sujeitos restantes. Altura do pico – Primeira linha de base.



Figura 4.14.: Variação percentual para 14 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Primeira linha de base.



Figura 4.15.: Variação percentual para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico – Primeira linha de base.

pico. Com os procedimentos citados encontrou-se os resultados mostrados nas Figuras 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15. Dados de NAAG de dois sujeitos tiveram que ser descartados devido à sua baixa qualidade. Para o NAA foi obtido uma SNR maior que 11 novamente, e para o NAAG uma SNR maior que 4.

Dezesseis (de 20) sujeitos seguiram o mesmo padrão de decréscimo do NAA (entre -1% e -61%) durante o estímulo, com uma tendência a retornar aos níveis basais no final do paradigma na maioria dos casos (Fig. 4.12), e três seguiram padrão de aumento de NAA (entre 3% e 11%, Figura 4.13). Quatorze (de 18) sujeitos seguiram um padrão inverso para o NAAG: aumento entre 17% e 183% durante a ativação com a tendência de retornar aos níveis basais no final do paradigma (Figura 4.12) e quatro sujeitos apresentaram um padrão de decréscimo de NAAG (entre -2% e -14%, Figura 4.15). No total, doze sujeitos apresentaram ambos os padrões de variação (decréscimo de NAA e aumento de NAAG). Estes indivíduos tiveram em média uma variação de -19% para o NAA e aumento de 62% para o NAAG durante o estímulo, retornando para -14% (NAA) e 47% (NAAG) no final do paradigma.

Comparando-se os resultados de NAA obtidos nesta análise com os da análise anterior, nota-se que os valores percentuais variaram, porém isso não é inesperado, uma vez que agora foi considerada uma linha de base e a variação percentual foi calculada através da altura do pico. Apesar disso, quase todos os sujeitos mantiveram-se no mesmo grupo de padrão de variação, com exceção dos Sujeitos 4, 5, 11 e 20, que não seguiram conjuntamente o mesmo padrão quando comparadas as duas análises. As discrepâncias existentes podem ser devido aos fatores comentados acima. Por outro lado, dezesseis sujeitos seguiram o mesmo padrão de decréscimo em ambas as análises, enquanto o Sujeito 20 não o seguiu em ambas (Figuras 4.9 e 4.13), o que pode indicar consistência de resultados independente da forma de análise.

A Figura 4.16 mostra a comparação entre as duas aquisições do Sujeito 1 para o caso do NAA. Ambas seguem o mesmo padrão, embora a varição do Sujeito 21 não seja oscilatória como a do Sujeito 1. A comparação entre os dados de NAAG do mesmo sujeito é mostrado na Figura 4.17, onde se vê que o padrão de variação foi bem semelhante, mudando apenas os valores percentuais.

De acordo com os testes estatísticos, os resultados foram significantes.



Figura 4.16.: Variação percentual do NAA para os dois dados do Sujeito 1. Altura do pico – Primeira linha de base.



Figura 4.17.: Variação percentual do NAAG para os dois dados do Sujeito 7. Altura do pico – Primeira linha de base.



Figura 4.18.: Variação percentual para os 16 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de diminuição do NAA durante o estímulo. Altura do pico – Segunda linha de base.

4.1.5. Análise através da altura do pico – Segunda linha de base

Um problema da análise anterior é que foi usado o mesmo intervalo de pontos de início e fim do pico de NAA e NAAG para todos os sujeitos, o que não é verdade, uma vez que há variação entre sujeitos (e até entre os espectros de um mesmo sujeito) para o intervalo em que os picos de NAA e NAAG estão localizados. Portanto, no momento de calcular a linha de base de referência, tanto para os espectros do experimento de NAA quanto do experimento de NAAG, foi feita a média entre os 10 pontos no início e no final do pico em torno de 2,5ppm para cada sujeito.

Este ajuste mudou um pouco os valores dos resultados, como pode ser visto nas Figuras 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21. Dezesseis (de 20) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo do NAA (entre -4% e -62%), e quatorze (de 18) sujeitos seguiram o padrão de aumento de NAAG (entre 10% e 143%), com a tendência de voltar ao estado basal. Os outros sujeitos apresentaram variações contrárias: quatro sujeitos seguiram padrão de aumento para o NAA (entre 1% e 9%) e quatro sujeitos seguiram padrão de decréscimo para o NAAG (entre -14% e -30%). Assim como anteriormente, doze sujeitos seguiram ambos os padrões de variação e com valores semelhantes: média de -19% de decréscimo para o NAA (53% de aumento para o NAAG) durante o estímulo, com retorno para -14% (42%) no final do paradigma. O resultado do NAA é similar ao encontrado na análise anterior (Figuras 4.12 e 4.13), com quase todos os sujeitos permanecendo nos respectivos grupos anteriores,



Figura 4.19.: Variação percentual do NAA para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico – Segunda linha de base.



Figura 4.20.: Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Segunda linha de base.



Figura 4.21.: Variação percentual do NAAG para os 4 sujeitos restantes. Altura do pico – Segunda linha de base.

sendo exceção os Sujeitos 4, 8 e 12 (Figuras 4.18 e 4.19). Para o NAAG os valores também variaram pouco entre os sujeitos, de modo que o padrão de variação continuou o mesmo (compare as Figuras 4.14 e 4.15 com as Figuras 4.20 e 4.21). A SNR foi maior que 13 para o NAA e maior que 5 para o NAAG.

As Figuras 4.22 e 4.23 mostram a variação percentual para os sujeitos que tiveram dados repetidos de NAA e NAAG, respectivamente. Nesta análise ambos os dados seguem padrões de variação bem semelhantes.

Os resultados desta análise foram significantes.

4.1.6. Análise através da altura do pico – Terceira linha de base

Como pode ser visto pela Figura 4.11, a linha de referência possui uma inclinação que não acompanha a linha de base do espectro, o que pode resultar em quantificações menos confiáveis, já que não representa corretamente esta última. Então, pontos mais distantes do pico de NAA e NAAG foram considerados, onde não havia picos residuais, nem alterações da linha de base do espectro, i.e., regiões do espectro em que o ruído acompanhava uma linha reta horizontal. Tendo isso em mente, buscou-se traçar uma nova linha de referência que, como mostra a Figura 4.24, seguisse paralela à linha de base, no caso do NAA. Essa correção não foi feita para o experimento de NAAG porque como os espectros são bem mais ruidosos, não foi possível em princípio encontrar uma região próxima do pico que tivesse



Figura 4.22.: Variação percentual do NAA para os dois dados do Sujeito 1. Altura do pico – Segunda linha de base.



Figura 4.23.: Variação percentual do NAAG para os dois dados do Sujeito 7. Altura do pico – Segunda linha de base.



Figura 4.24.: Linha de base estimada para espectros de NAA e NAAG.

apenas ruído com linha de base horizontal.

Como resultado, encontrou-se que dezessete sujeitos seguiram um padrão de variação com decréscimo de NAA (entre -2% e -60%), alguns com tendência a voltar ao estado basal ao final do paradigma (Figura 4.25). Três sujeitos apresentaram variações contrárias (Figura 4.26), ou seja, aumento de NAA com o estímulo (entre 2% e 16%). Com este ajuste fino, a média dos valores não variou consideravelmente quando comparados com a quantificação anterior, nem os valores individuais de quase todos os sujeitos. Somente os Sujeitos 12, 16 e 20 não seguiram o padrão de decréscimo de NAA, de modo que, quando comparado com a análise anterior, os Sujeitos 12 e 20 continuaram no segundo grupo. O Sujeito 16, que agora está neste segundo grupo, possui uma variação percentual nos blocos de estímulo muito pequena (entre 1% e 2%), portanto pode ser que seu enquadramento neste segundo grupo seja devido à variação decorrente da mudança de análise, e não reflita corretamente a variação percentual do metabólito. O valor da SNR foi maior que 14.

Pela Figura 4.27 é possível ver que o padrão de variação do Sujeito 1 para seus dois conjuntos de dados ainda apresenta diminuição de NAA durante o estímulo, embora nesta análise a variação percentual seja diferente.

Nesta quantificação, de acordo com os testes estatísticos, os resultados são significantes.

4.1.7. Análise através da área sob o pico

Conforme dito anteriormente, a área sob determinado pico é proporcional à concentração do metabólito correpondente [21], então uma análise baseada na área seria um bom indicativo para a posterior análise da variação da concentração do NAA ou do NAAG. Com



Figura 4.25.: Variação percentual para 17 sujeitos que seguiram padrão semelhante de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Terceira linha de base.



Figura 4.26.: Variação percentual dos 3 sujeitos restantes, que seguiram padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Terceira linha de base.



Figura 4.27.: Variação percentual do NAA para as duas aquisições do Sujeito 1. Altura do pico – Terceira linha de base.

este intuito, a área sob o pico em ~2,5ppm foi calculada para o NAA e para o NAAG, utilizando a linha de base usada na última análise da altura. Com este procedimento foram obtidos valores de variação para o NAAG muito diferentes dos encontrados anteriormente, cujo valor mais baixo foi -1068%, para o quarto ponto temporal do Sujeito 9. Porém, esta variação está errada, como é possível ver na Figura 4.28, onde a área do quarto espectro não é dez vezes menor que a do primeiro espectro. Para contornar este problema e verificar se a quantificação estava realmente errada, foi calculada a área sob o pico sem levar em conta a linha de base. Se tal análise estivesse correta, os valores desta quantificação deveriam ser semelhantes ao encontrado antes, o que não aconteceu. A variação percentual para o mesmo espectro do mesmo sujeito foi 3%. Isso indica que a linha de base usada não estava correta para a análise da área, pelo menos para o NAAG, pois de acordo com o local onde passava, subestimava ou superestimava o resultado.

Contudo, para o NAA tal problema não ocorreu. A variação deste metabólito usando a linha de base está mostrada nas Figuras 4.29 e 4.30. Doze sujeitos seguiram o padrão de decréscimo (entre -16% e -76%) do NAA durante o estímulo, e oito seguiram padrão contrário (entre 3% e 95%). A Figura 4.75 mostra a variação percentual para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Estes resultados não são estatisticamente significantes, pois tanto o teste t quanto o de Wilcoxon forneceram um valor p > 0,12 para todos os pontos temporais.



Figura 4.28.: Primeiro (em azul) e quarto (em verde) espectro do Sujeito 9 para o experimento de NAAG. A área sob o pico de NAAG (em torno de 2,5ppm) no quarto espectro não é 10 vezes maior que a área do primeiro espectro.

O resultado da análise através da área sem usar a linha de base é mostrada nas Figuras 4.32 e 4.33, para o NAA. Foi encontrada uma diminuição entre -2% e -87% para dezoito sujeitos, e um aumento de 35% e 43% para dois sujeitos. Os únicos dois sujeitos (4 e 5) que não seguiram o padrão de descréscimo de NAA no cáculo da área (Figura 4.33), também não o seguiram no cálculo da altura (Figura 4.26). Os sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo também o seguiram na análise da variação através da altura (Figura 4.25). Para o NAAG há também dois grupos: um cujo os sujeitos apresentaram um padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (entre 4% e 171%, Figura 4.34) e outro cujo os sujeitos apresentaram um decréscimo de NAAG (entre -12% e -83%, Figura 4.35). Dentre os quinze sujeitos que estavam seguindo o padrão de aumento do NAAG nas análises anteriores, apenas nove continuaram seguindo o mesmo padrão. E dos quatro sujeitos que seguiam o padrão de diminuição do NAAG, somente o Sujeito 11 continuou no mesmo grupo, os outros apresentaram padrão diferente nesta análise. Os valores da SNR aqui calculados são iguais ao da seção anterior para o NAA e iguais aos da Seção 4.1.5 para o NAAG, uma vez que seu cálculo depende da altura do pico analisado.

Vale ressaltar que o cálculo da área sob o pico sem levar em consideração a linha de base não é muito confiável, especialmente para o NAAG, uma vez que, como mostra a Figura 4.11, a região do pico de NAAG está abaixo do valor zero, o que pode causar erros



Figura 4.29.: Variação percentual para os 12 sujeitos que seguiram padrão semelhante de diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico com linha de base.



Figura 4.30.: Variação percentual para os 8 sujeitos que seguiram padrão semelhante de aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico com linha de base.



Figura 4.31.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Área sob o pico com linha de base.



Figura 4.32.: Variação percentual para 18 sujeitos que seguiram padrão semelhante de diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico.



Figura 4.33.: Variação percentual para 2 sujeitos que seguiram padrão semelhante de diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico.



Figura 4.34.: Variação percentual para 9 sujeitos que seguiram padrão semelhante de aumento de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico.



Figura 4.35.: Variação percentual para 8 sujeitos que seguiram padrão semelhante de decréscimo de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico.

associados à determinação correta da área (e também altura) sob o pico. Essa divergência dos resultados, especialmente para o NAAG, pode ser explicada pelo fato citado acima e também que como o pico de NAAG é menor, sua relação sinal-ruído também é, portanto variações do ruído podem causar erros na quantificação pela área, uma vez que estaria sendo somada a contribuição do ruído, que neste caso não é pequena. O ruído do espectro influencia a linha de base, aumentando-a ou diminuindo-a, o que por sua vez, torna o resultado da área sub ou superestimado. Além disso, a quantificação pela área apresenta outras dificuldades. Para calcular a área do pico é necessário saber os pontos iniciais e finais do mesmo, contudo, isto não é tão simples de se definir. Os picos nem sempre começam e terminam nos mesmos pontos, para todos os sujeitos, o que faz desta tarefa um procedimento mais delicado. Consequentemente, esses problemas são fontes de erro para a quantificação devido à subjetividade inerente à interação do usuário.

As Figuras 4.36 e 4.37 apresentam a variação percentual do NAA e do NAAG, respectivamente, para os segundos dados dos Sujeitos 1 e 7. Novamente as variações seguem o mesmo padrão, com pouca diferença para o caso do NAA.

Para o NAA, o terceiro e quarto pontos temporais foram significantes com um nível de confiança de 95%, enquanto que o segundo ponto teve um nível de 94%. O último ponto do experimento de NAA e todos os pontos do experimento de NAAG apresentaram p > 0,1, portanto não são estatisticamente significantes.



Figura 4.36.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Área sob o pico.



Figura 4.37.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Área sob o pico.

4.1.8. Análise através da altura do pico – Espectro absoluto

Como dito anteriormente, após todas as etapas de pré-processamento foi realizada uma correção de fase manual com o intuito de deixar os espectros o mais próximo possível da forma encontrada em [15]. Esta correção porém, é também uma fonte adicional de erro, e por ser manual depende do julgamento do usuário. Como esta correção de fase é sutil, ela não é extremamente necessária no caso dos espectros de NAA e NAAG, portanto, optou-se por fazer dois procedimentos alternativos: o primeiro foi calcular a variação dos dois metabólitos sem considerar a correção de fase e a segunda foi calcular a área e a altura dos espectros absolutos. O primeiro procedimento será tratado mais adiante, pois junto com ele foi feita outra mudança no pré-processamento para deixar a análise mais robusta. O segundo procedimento foi escolhido porque os espectros absolutos não dependem de nenhum tipo de faseamento, o que elimina a introdução de um possível viés na análise, apesar da concentração dos metabólitos ser proporcional à área do espectro real. De qualquer forma, este último procedimento indica se há alguma variação dos metabólitos mediante estímulo, independente de sua concentração, e pode ser usado para comparar seu resultado com os obtidos anteriormente. A Figura 4.38 mostra a forma dos picos de NAA e NAAG, para o espectro absoluto.

O resultado para a variação percentual do NAA com o cálculo da altura dos picos está mostrado nas Figuras 4.39 e 4.40. Dezenove sujeitos seguiram o mesmo padrão de decréscimo de NAA (entre -8% e -51%), enquanto o outro sujeito teve um aumento de 13% (Figura 4.40). Para o NAAG, dezesseis sujeitos seguiram o padrão de aumento do metabólito (entre 4% e 173%), enquanto os outros dois sujeitos seguiram padrões diferentes (diminuição entre -31% e -45%, Figura 4.42). Estes dois sujeitos apresentaram o mesmo padrão de variação de NAAG em todas as análises anteriores, com exceção da última análise, onde foi usada a área sob o pico. Nesta análise, a SNR foi maior que 8 para o NAA e maior que 3 para o NAAG (com exceção do terceiro espectro (de 5) do Sujeito 2, do segundo espectro do Sujeito 5 e do primeiro, terceiro e quarto espectros do Sujeito 11, cujos valores da SNR estão entre 1,5 e 3).

Os dois conjuntos de dados do Sujeito 7, para o NAAG, seguiram o mesmo padrão de variação (Figura 4.44), conforme anteriormente. Os dados do Sujeito 1, porém, não apresentaram a mesma variação do Sujeito 21, na maioria dos pontos temporais (Figura 4.43), sendo o único sujeito que não se enquadrou no Grupo 1. O Sujeito 21, por outro lado, se enquadra neste grupo.



Figura 4.38.: Picos de NAA (acima) e NAAG (abaixo) em torno de 2,5ppmem para um espectro absoluto de hidrogênio.



Figura 4.39.: Variação percentual para 19 sujeitos que seguiram padrão semelhante de decréscimo de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.40.: Variação percentual para 1 sujeito que seguiu padrão diferente do grupo da Figura 4.39. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.41.: Variação percentual para 16 sujeitos que seguiram padrão semelhante de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.42.: Variação percentual para os 2 sujeitos restantes, cujos valores não acompanharam o padrão apresentado na Figura 4.41. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.43.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.44.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Altura do pico – Espectro absoluto.

De acordo com os testes estatísticos, os resultados são significantes.

4.1.9. Análise através da área sob o pico – Espectro absoluto

O cálculo da área sob o pico do espectro absoluto foi feito sem usar linha de base e deu resultados contrários ao esperado, pois, tanto para o NAA quanto para o NAAG, sujeitos que haviam seguido o mesmo padrão em todas as quantificações anteriores nesta análise seguiram padrões opostos. Para o NAA, cinco sujeitos seguiram o padrão de decréscimo durante o estímulo (entre -4% e -57%, Figura 4.45) e quinze seguiram o padrão de aumento do metabólito (entre 3% e 90%, Figura 4.46). Quatro sujeitos seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (entre 2% e 8%, Figura 4.47) e quatorze seguiram o padrão contrário (entre -2% e -64%, Figura 4.48). Este resultado é inesperado porque existem sujeitos que estavam no mesmo grupo de variação durante todas as quantificações e agora tiveram padrões diferentes. Para o NAA, os Sujeitos 10, 13, 14, 15 e 17 são os únicos que mantiveram o mesmo padrão de variação desde o início, e dos 20 sujeitos, sete seguiram agora padrões que não haviam seguido antes, em quaisquer análises anteriores (Sujeitos 2, 3, 6, 7, 9, 18 e 19). Para o NAAG, os Sujeitos 5, 11 e 14, seguiam o padrão contrário ao encontrado agora, em todas as análises anteriores (com exceção do Sujeito 5, que no cálculo da área também estava no Grupo 1). Tais resultados, tanto para o NAA quanto para o NAAG, não são confiáveis, uma vez que os espectros absolutos não seguem uma linha de



Figura 4.45.: Variação percentual para 5 sujeitos que seguiram padrão semelhante de decréscimo de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.



Figura 4.46.: Variação percentual para 15 sujeitos que seguiram padrão aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.



Figura 4.47.: Variação percentual para 4 sujeitos que seguiram padrão semelhante de aumento de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.



Figura 4.48.: Variação percentual para 14 sujeitos que seguiram padrão semelhante de decréscimo de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Espectro absoluto.



Figura 4.49.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Area sob o pico – Espectro absoluto.

base paralela ao eixo horizontal (Figura 4.38). Esse problema pode ter sido o responsável pela mudança nos padrões de variação encontrados para a maioria dos sujeitos desta seção.

As Figuras 4.49 e 4.50 mostram a variação percentual para os sujeitos escaneados duas vezes, no experimento de NAA e de NAAG, respectivamente. Sua variação percentual seguiu o mesmo padrão nas duas aquisições durante o estímulo visual.

Para o NAA, o único conjunto de dados estatisticamente significante é o correspondente ao segundo ponto temporal, enquanto que para o NAAG todos os resultados são significantes.

4.1.10. Resumo dos resultados obtidos

O resumo dos resultados obtidos, com o grupo de cada sujeito, nas diferentes quantificações realizadas até agora está mostrado nas Tabelas 4.1 e 4.2. Para o experimento de NAA, os Sujeitos 10, 13, 14, 15 e 17 seguiram o mesmo padrão em todas as quantificações feitas (diminuição de NAA). Os Sujeitos 2, 7, 9 e 19 acompanharam o mesmo padrão em sete das oito quantificações realizadas (diminuição de NAA), sendo a exceção a análise da Seção 4.1.9, cujo resultados são duvidosos devido ao problema exposto na mesma. Os Sujeitos 3, 6, 8, 18 e 20 permaneceram no mesmo grupo (diminuição de NAA, com exceção do Sujeito 20) em seis das oito análises, enquanto os Sujeitos 1, 4, 11 e 16 acompanharam o mesmo padrão de decréscimo de NAA em cinco das oito quantificações. Os Sujeitos 5 e 12 estiveram em metade das aquisições no Grupo 1 e em outra metade no Grupo 2. Os



Figura 4.50.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Área sob o pico – Espectro absoluto.

dois conjuntos de dados do Sujeito 1 concordaram em padrão de variação em sete das oito análises.

No experimento de NAAG, os Sujeitos 1, 2, 9, 10, 13, 15, 16, 17 e 20 seguiram o mesmo padrão de aumento de NAAG em quatro das cinco quantificações⁶. Os Sujeitos 3, 5, 7, 12, 18 e 19 seguiram o mesmo padrão de aumento de NAAG (Grupo 1) em três das cinco diferentes análises, enquanto que os Sujeitos 8, 11 e 14 seguiram o padrão contrário (Grupo 2) nas mesmas análises. Os dois conjuntos de dados do Sujeito 7 concordaram em padrão de variação em todas as análises.

Em suma, quatorze (de 20) sujeitos seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo na maioria das análises (em seis das oito, sendo o número aumentado para dezoito se consideradas cinco das oito análises) e quinze (de 18) sujeitos seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (em três das cinco análises). A Tabela 4.3 mostra a faixa de valores percentuais de variação de NAA e NAAG para as diferentes análises. A faixa de valores para a diminuição de NAA é semelhante em todas as quantificações, com exceção apenas da primeira quantificação (que conforme foi explicado não é muito confiável), cujo valor mínimo foi de -201%. O mesmo pode ser dito para o experimento de NAAG, cuja faixa de valores para o aumento do metabólito também é parecida, com

⁶Há cinco análises e não seis porque não o reajuste da linha de base não foi feito para o NAAG no segundo cálculo da altura do pico. Portanto, para este metabólito, os resultados da altura do pico usando a primeira linha de base e usando a segunda linha de base são iguais.

Tabela 4.1.:	Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para o NAA. Os
	números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se enquadraram, conforme
	foi explicado no início deste capítulo.

NAA				
Sujeitos	Área sob o pico 1a. quantificação	Altura do pico 1a. linha de base	Altura do pico 2a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	2	1	1
5	1	2	2	1
6	1	1	1	1
7	1	1	1	1
8	1	1	2	1
9	1	1	1	1
10	1	1	1	1
11	2	1	1	1
12	1	1	2	2
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	2
17	1	1	1	1
18	1	1	1	1
19	1	1	1	1
20	2	2	2	2
21	-	1	1	1

NAA				
Sujeitos	Área sob o pico 3a. linha de base	Área sob o pico sem linha de base	Altura do pico Espectro absoluto	Área sob o pico Espectro absoluto
1	2	1	2	2
2	1	1	1	2
3	2	1	1	2
4	1	2	1	2
5	1	2	1	2
6	2	1	1	2
7	1	1	1	2
8	1	1	1	2
9	1	1	1	2
10	1	1	1	1
11	2	1	1	2
12	2	1	1	2
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	2	1	1	2
17	1	1	1	1
18	2	1	1	2
19	1	1	1	2
20	2	1	1	2
21	2	1	1	2

Tabela 4.2.:	Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para o NAAG.
	Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se enquadraram, conforme
	foi explicado no início deste capítulo.

NAAG				
Sujeitos	Área sob o pico 1a. quantificação	Altura do pico 1a. linha de base	Altura do pico 2a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base
1	-	1	1	-
2	-	1	1	-
3	-	1	1	-
4	-	excluído	excluído	-
5	-	2	2	-
6	-	excluído	excluído	-
7	-	1	1	-
8	-	2	2	-
9	-	1	1	-
10	-	1	1	-
11	-	2	2	-
12	-	1	1	-
13	-	1	1	-
14	-	2	2	-
15	-	1	1	-
16	-	1	1	-
17	-	1	1	-
18	-	1	1	-
19	-	1	1	-
20	-	1	1	-
21	-	1	1	-
NAAG				
----------	--------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------
Sujeitos	Área sob o pico 3a. linha de base	Área sob o pico sem linha de base	Altura do pico Espectro absoluto	Área sob o pico Espectro absoluto
1	-	1	1	2
2	-	2	1	1
3	-	2	1	2
4	-	excluído	excluído	excluído
5	-	1	2	1
6	-	excluído	excluído	excluído
7	-	2	1	2
8	-	1	1	2
9	-	1	1	2
10	-	1	1	2
11	-	2	1	1
12	-	2	1	2
13	-	1	1	2
14	-	1	2	1
15	-	1	1	2
16	-	1	1	2
17	-	1	1	2
18	-	2	1	2
19	-	2	1	2
20	-	1	1	2
21	-	2	1	2

Tabela 4.3.: Intervalo de variações percentuais dos sujeitos para cada padrão de variação do NAA e do NAAG.

NAA				
Grupo	Área sob o pico 1a. quantificação	Altura do pico 1a. linha de base	Altura do pico 2a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base
1	-2 $\%$ 201 $\%$	-1 $\%$ – -61 $\%$	-4% $-62%$	-3 $\%$ – -60 $\%$
2	7%-34%	3%-11%	1%-9%	2%-16%
Grupo	Área sob o pico	Área sob o pico	Altura do pico	Área sob o pico
	3a. linha de base	sem linha de base	Espectro absoluto	Espectro absoluto
1	- 16% – - 76%	-2%87%	-8%51%	-4%57%

N	Α	A	G
			-

Grupo	Área sob o pico 1a. quantificação	Altura do pico 1a. linha de base	Altura do pico 2a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base
1	-	17%-183%	10%-143%	-
2	-	- 2% 14\%	- 14% – - 30%	-
Grupo	Área sob o pico	Área sob o pico	Altura do pico	Área sob o pico
	3a. linha de base	sem linha de base	Espectro absoluto	Espectro absoluto
1	-	4%-171%	4%-173%	2%-8%
2	-	-12%83%	-31%45%	-2 $\%$ – -64 $\%$

exceção da realizada na Seção 4.1.9, cujos problemas já foram discutidos. Porém, para o grupo cujo NAA aumentou e cujo NAAG diminuiu, a faixa de valores percentuais também mudou, não seguindo valores semelhantes em nenhuma das quantificações. Tais resultados parecem ser, em geral, consistentes e independentes da análise para o caso de decréscimo de NAA e aumento de NAAG (salvo a quantificação da Seção 4.1.9 para o NAAG). Os padrões de variação contrários não apresentaram esta uniformidade, pois podem ser resultados que não representam realmente a variação dos metabólitos mediante o estímulo.

4.2. Segundo conjunto de resultados

Com o intito de melhorar a visualização dos resultados e tornar a análise mais robusta, foi feita uma modificação no processamento dos dados, para depois quantificá-los novamente. Tal mudança consistiu da não exclusão dos espectros entre os blocos de repouso e estímulo, e da soma dos espectros de 20 em 20, mas com um passo de 10, i.e., foram somados do espectro 1 ao espectro 20, depois do espectro 11 ao 30, do 21 ao 40, etc. até a última soma, que foi do espectro 81 ao 100. Portanto, foram obtidos 9 espectros resultantes, um para cada uma destas somas. A soma foi feita com 20 espectros para que a relação sinal-ruído fosse considerável, e o passo de 10 foi escolhido para haver mais pontos temporalmente, obtendo consequentemente uma visualização melhor da variação metabólica ao longo da aquisição. Um passo menor que 10 não foi tomado porque apresentaria flutuações na variação dos metabólitos, como pode ser visto para o caso do NAA na Figura 4.51, onde foi feita a soma de 20 em 20 com passo 5 e com passo de 10, para dois sujeitos. O eixo das abscissas indica o número de espectros obtidos (9 para passo de 10 e 18 para passo de 5), enquanto o eixo das ordenadas mostra a variação percentual. O Sujeito 10 não foi considerado nas análises porque seu espectro resultante apresentou picos em 2ppm e 3ppm que deveriam ter sido cancelados, quando foi feita a combinação dos espectros pares com os espectros ímpares.

4.2.1. Análise através da altura do pico

Após fazer os procedimentos citados a altura do pico de NAA e de NAAG foi calculada, nos nove espectros resultantes para cada sujeito. Porém, desta vez, a última correção de fase não foi feita, porque apesar desta última correção ter sido feita para ajustar os espectros o mais próximo possível do mostrado em [15], era uma fonte adicional de erro, já que dependia do julgamento do usuário. Além disso, esta correção não era extremamente necessária, pois



Figura 4.51.: Variação percentual do NAA para dois sujeitos, utilizando passos de 5 (figuras à esquerda, uma para cada sujeito) e de 10 (figuras à direita, uma para cada sujeito).
Os dezoito (para passo de 5), ou nove (para passo de 10), pontos no eixo das abscissas correpondem a cada um dos dezoito, ou nove, espectros resultantes.



Figura 4.52.: Primeiro espectro (de 9) para o Sujeito 1, no experimento de NAA. O pico de NAA está em torno de 2,5ppm.

os espectros já possuíam uma forma bem característica, tanto para o NAA (Figura 4.52), quanto para o NAAG (Figura 4.53). A linha de base utilizada foi a mesma da Seção 4.1.6, que até o momento é a mais adequada (Figuras 4.54 e 4.55).

Dezesseis (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o período de estímulo (entre -4% e -60%, Figura 4.56), e três sujeitos seguiram padrão contrário (entre 5% e 16%, Figura 4.57). Quinze (de 18) sujeitos apresentaram padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (entre 14% e 150%, Figura 4.58), e três sujeitos seguiram o padrão de diminuição do metabólito (entre -24% e -38%, Figura 4.59). Para o NAA, os Sujeitos 1, 5 e 20 se enquadraram no Grupo 2, concordando com análises anteriores; para o NAAG os sujeitos do Grupo 2 são o 5, o 11 e o 14, o que também concorda com os resultados já mostrados. Os valores da SNR foram maiores que 14 para o NAA e 3 para o NAAG. Além dos valores individuais, também foi calculada a média da variação dos sujeitos que se enquadraram no Grupo 1 (diminuição de NAA, aumento de NAAG), nesta quantificação, junto com o respectivo desvio padrão. O resultado está mostrado nas Figuras 4.60 e 4.61, para o NAA e o NAAG, respectivamente.

Os pontos entre os blocos de estímulo e repouso (segundo e sexto pontos) correpondem a espectros cuja soma foi feita com metade deles sendo do bloco *on* e metade sendo do bloco *off.* Isso significa que temos uma contribuição de ambos os períodos, mas apesar de parecer "contaminada" à primeira vista com espectros de situações diferentes, não deve ser



Figura 4.53.: Primeiro espectro (de 9) para o Sujeito 1, no experimento de NAAG. O pico de NAAG está em torno de 2,5ppm.



Figura 4.54.: Exemplo de espectro para experimento de NAA, com a terceira tentativa de linha de base.



Figura 4.55.: Exemplo de espectro para experimento de NAAG, com a terceira tentativa de linha de base.



Figura 4.56.: Variação percentual para os 16 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico.



Figura 4.57.: Variação percentual para os 3 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Altura do pico.



Figura 4.58.: Variação percentual para os 15 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico.



Figura 4.59.: Variação percentual para os 3 sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAAG durante o estímulo. Altura do pico.



Figura 4.60.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Note que estas não são barras de erro, e sim barras que indicam a faixa do desvio padrão dos sujeitos com relação à média. Altura do pico.



Figura 4.61.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Note que estas não são barras de erro, e sim barras que indicam a faixa do desvio padrão dos sujeitos com relação à média. Altura do pico.

desconsiderada, pois contém informações de períodos com estímulo que podem ser (como em alguns casos mostra ser) os pontos de variação máxima dos metabólitos. Embora tais pontos contenham os espectros que foram excuídos nas análises anteriores (devido ao descompasso entre o *scanner* e o sistema *Eloquence*) isso não é mais um problema como antes (onde a exclusão de tais espectros era fundamental para se ter certeza de que cada um dos cinco pontos temporais representasse corretamente um bloco *on* ou *off*), pois estes são pontos de transição que de qualquer maneira contém informações dos períodos de repouso e de estímulo. Portanto, não se sabe exatamente, de qualquer forma, em qual instante dentro desse intervalo ocorreu o início (ou fim) do estímulo.

As Figuras 4.62 e 4.63 mostram a variação percentual para os sujeitos escaneados duas vezes, no experimento de NAA e de NAAG, respectivamente. Sua variação percentual seguiu, novamente, o mesmo padrão nas duas aquisições, especialmente para o NAAG.

De acordo com os testes estatísticos os resultados são significantes.

4.2.2. Análise através da altura do pico – Espectro absoluto

A altura dos picos de NAA e NAAG dos espectros absolutos para todos os sujeitos também foi calculada, utilizando o procedimento da seção anterior. Obtive-se, então, os seguintes resultados: dezoito (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA



Figura 4.62.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico.



Figura 4.63.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Altura do pico.



Figura 4.64.: Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o mesmo padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.

mediante o estímulo (entre -10% e -54%, Figura 4.64) e um sujeito seguiu o padrão contrário (16%, Figura 4.65). Doze (de 18) sujeitos apresentaram padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (entre 17% e 126%, Figura 4.66) e seis sujeitos apresentaram um padrão de decréscimo do metabólito (entre -19% e -31%, Figura 4.67). Para o NAA os sujeitos aqui agrupados concordam com o agrupamento da Seção 4.1.8, e para o NAAG os sujeitos seguem parcialmente os agrupamentos anteriores. As exceções são o Sujeito 13, que não se enquadrou no Grupo 2 em nenhuma análise anterior, e os Sujeitos 2 e 19, que estiveram neste grupo na Seção 4.1.7. Nesta quantificação, para o NAAG, os Sujeitos 2, 8 e 11 apresentaram variações percentuais para o segundo e sexto pontos muito maiores que para os pontos adjacentes.

Os valores médios para sujeitos do Grupo 1, com as respectivas barras de desvio padrão, tanto do experimento de NAA, quanto do experimento de NAAG, estão mostrados nas Figuras 4.68 e 4.69, respectivamente. Os valores da SNR foram maiores que 8 para o NAA e maior que 3 para o NAAG (com exceção do Sujeito 11 que apresentou valor menor que 3). Uma outra exceção foi o Sujeito 2, para o NAAG, cuja SNR foi negativa. Na realidade, o valor da altura do pico de NAAG para seu primeiro espectro foi negativa, o que significa que a linha de base estava acima do valor do pico, para o espectro absoluto deste sujeito. Isto indica um problema nos pontos utilizados para definir os limites da linha de base. Além disso, definir uma linha de base para os espectros absolutos é mais difícil que



Figura 4.65.: Variação percentual para o sujeito que apresentou aumento de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.66.: Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.67.: Variação percentual para os 6 sujeitos que apresentaram padrão de decréscimo de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.68.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.69.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Espectro absoluto.

para os espectros reais, pois os primeiros não possuem a própria linha de base horizontal, mas sim ligeiramente inclinada, como pode ser visto na Figura 4.38.

Como anteriormente, os dois resultados do Sujeito 7 concordam em padrão de variação (Figura 4.71), porém os resultados do Sujeito 1 seguiram padrões contrários, como visto na Figura 4.70. Os resultados do Sujeito 21 seguem o padrão do Grupo 1 para os dois experimentos.

De acordo com os testes estatísticos, os resultados são significantes, com exceção apenas dos correspondentes ao sexto e ao último pontos temporais do experimento de NAAG.

4.2.3. Análise através da área sob o pico

Assim como na Seção 4.1.7, a variação percentual do NAA e do NAAG por meio da área sob os respectivos picos foi calculada, com o procedimento adotado nessa segunda parte dos resultados. Novamente foi considerada a linha de base utilizada na determinação da altura do pico e, da mesma forma que na Seção 4.1.7, a variação percentual para o NAAG alcançou valores altos. A Figura 4.72 mostra os espectros do Sujeito 13, cuja variação de NAAG foi de -1225%. Evidentemente a área sob o pico (em torno de 2,5ppm) não é doze vezes menor. Tais resultados sugerem fortemente que a linha de base usada para o cálculo da área sob o pico não está correta. Para o NAA, oito (de 19) sujeitos seguiram o



Figura 4.70.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.71.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Altura do pico – Espectro absoluto.



Figura 4.72.: Primeiro (azul) e terceiro (vermelho) espectros do Sujeito 13 para o experimento de NAAG, com as respectivas linhas de base (verde escuro e verde água).



Figura 4.73.: Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Terceira linha de base.



Figura 4.74.: Variação percentual para os 14 sujeitos que apresentaram padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Terceira linha de base.



Figura 4.75.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Área sob o pico – Terceira linha de base.



Figura 4.76.: Variação percentual para os 15 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Sem linha de base.

padrão de decréscimo durante o estímulo (entre -18% e -74%, Figura 4.73) e onze seguiram o padrão contrário (aumento entre 8% e 173%, Figura 4.74). O agrupamento dos sujeitos é semelhante ao mostrado na na Seção 4.1.7. A Figura 4.75 mostra a variação percentual para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Os testes estatísticos forneceram p > 0,1 para todos os pontos temporais, concordando também com o resultado da Seção 4.1.7.

Como passo seguinte, a área sob o pico foi calculada sem usar a linha de base. Os resultados mostram que quinze (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo (entre -19% e -133%, Figura 4.76), enquanto quatro sujeitos seguem padrão contrário (entre 22% e 128%, Figura 4.77). Para o NAAG os resultados não são confiáveis, conforme o que já foi discutido na Seção 4.1.7, com valores da variação percentual chegando a 800%. Esses valores altos são devido ao mal posicionamento dos espectros com relação ao eixo horizontal: alguns espectros possuem parte de sua linha de base em posições mais altas do que outros (Figura 4.78), o que aumenta os valores da área. O valor da SNR foi maior que 4 (com exceção do quarto espectro do Sujeito 4, cujo valor foi 2,8) para o NAA. A média dos sujeitos enquadrados no Grupo 1 para o NAA é mostrada na Figura 4.79. As variações percentuais dos dois conjuntos de dados do Sujeito 1 estão mostradas na Figura 4.80 e seguiram padrão semelhante. Os resultados para o NAA não foram significantes para o segundo e terceiro conjunto de pontos, enquanto que para os outros sim.

A área sob os picos de NAA e NAAG dos respectivos espectros absolutos também



Figura 4.77.: Variação percentual dos 4 sujeitos que seguiram o padrão contrário de variação de NAA. Área sob o pico – Sem linha de base.



Figura 4.78.: Primeiro (em azul) e sexto (em vermelho) espectros do Sujeito 20, cuja variação percentual chegou a 800%. A linha à esquerda do espectro vermelho está mais para cima do que a mesma região no espectro azul. Isso faz com que o valor da área seja maior para o espectro vermelho.



Figura 4.79.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Sem linha de base.



Figura 4.80.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Área sob o pico – Sem linha de base.



Figura 4.81.: Exemplo de linha de base e espectro absoluto para o experimento de NAA. Pela figura se vê esta linha de base (terceira tentativa) não acompanha o pico de NAA em aproximadamente 2,5ppm.



Figura 4.82.: Exemplo de linha de base e espectro absoluto para o experimento de NAAG. Pela figura se vê esta linha de base (terceira tentativa) não acompanha o pico de NAAG em aproximadamente 2,5ppm.

foi calculada usando a mesma linha base descrita no início desta seção (que foi também a usada na Seção 4.1.6 para o NAA e na Seção 4.1.5 para o NAAG). Porém, ela não serviu como linha de base, pois passa longe do pico, como pode ser visto nos espectros tomados como exemplo (Figuras 4.81 e 4.82); como resultado a variação percentual chegou a valores altos para alguns sujeitos (cerca de 1000% para o NAAG), que conforme apresentado anteriormente não são corretos. O passo seguinte foi, então, calcular a área sob o pico do espectro absoluto, mas sem levar em conta a linha de base, e como o resultado é muito parecido com o que será mostrado na Seção 4.2.8, onde será calculada levando-se em conta uma linha de base construída a partir de pontos bem próximos dos extremos do espectro, ele será mostrado apenas uma vez naquela seção.

4.2.4. Análise através da altura do pico – Espectro real sem linha de base

Como os espectros do experimento de NAA possuem a linha do ruído em cima do eixo das abscissas para quase todos os sujeitos (Figura 4.83), a variação percentual do NAA foi calculada sem levar em conta a linha de base usada anteriormente. Esse procedimento foi feito para retirar uma possível fonte de erro devido à interação do usuário. Tal procedimento não pode ser feito para o caso do NAAG nem para os espectros absolutos, porque esses espectros não estão alinhados paralelamente ao eixo horizontal (Figuras 4.84 e 4.38, respectivamente).

Dezoito (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo (entre -8% e -71%, Figura 4.85) e um sujeito seguiu o padrão contrário (11%, Figura 4.86). O valor médio de variação percentual para os sujeitos do Grupo 1 está mostrado na Figura 4.87 com as barras de desvio padrão correspondentes. O Sujeito 20 novamente não seguiu o padrão do Grupo 1. O valor da SNR é igual ao da Seção 4.2.3. Os dados do Sujeito 21 seguiram o mesmo padrão do Sujeito 1, como pode ser visto na Figura 4.88.

De acordo com os testes estatísticos, os resultados desta seção são significantes.

4.2.5. Análise através da altura do pico – Quarta linha de base

Como nem todos os espectros dos sujeitos do experimento de NAA possuíam a linha de base paralela ao eixo horizontal, e como para o experimento de NAAG e para o cálculo usando os espectros absolutos é necessário definir uma linha de base, foi feita uma nova



Figura 4.83.: Exemplo de espectro de NAA, com a linha do ruído praticamente paralela ao eixo horizontal.



Figura 4.84.: Exemplo de espectro de NAAG, com a linha do ruído não paralela ao eixo horizontal.



Figura 4.85.: Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Sem linha de base.



Figura 4.86.: Variação percentual o sujeito que seguiu o padrão contrário de variação. Altura do pico – Sem linha de base.



Figura 4.87.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Sem linha de base.



Figura 4.88.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico – Sem linha de base.



Figura 4.89.: Exemplo de espectro para experimento de NAA, com a quarta tentativa de linha de base.



Figura 4.90.: Exemplo de espectro para experimento de NAAG, com a quarta tentativa de linha de base.



Figura 4.91.: Variação percentual para os 18 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base.

quantificação levando-se em conta outros valores para construí-la. Isto também foi motivado pelo fato de que o Sujeito 2 apresentou valores negativos para a SNR, na análise mostrada na Seção 4.2.2, o que indica que os valores usados para se definir a linha de base não estavam corretos, pelo menos para este sujeito. Os pontos escolhidos para esta nova linha de base foram a média entre os dez primeiros e dez últimos pontos no espectro (que possui um total de 2048 pontos), para o NAA, e a média entre os pontos após o pico de NAAG (por volta de 1600, sendo que o pico de NAAG está em torno de 1300) e os últimos picos do espectro. A região escolhida não possui picos e está no eixo horizontal, portanto a linha de base construída acompanha este eixo (Figuras 4.89 e 4.90).

Dezoito (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo (entre -7% e -77%, Figura 4.91), enquanto um seguiu um padrão diferente (Figura 4.92), com aumento do metabólito nos três primeiros blocos de estímulo (9%), e decréscimo nos subsequentes. Quatorze (de 18) sujeitos seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (entre 26% e 172%, Figura 4.93), e quatro sujeitos seguiram padrão contrário (com diminuição entre -7% e -113%, Figura 4.94). Para o NAA, o Sujeito 20 novamente se enquadrou no Grupo 2 e os valores percentuais foram bem semelhantes aos da Seção 4.2.4; na verdade houve apenas um deslocamento destes valores, devido à linha de base. Para o NAAG os Sujeitos 5, 8 e 11 continuaram no Grupo 2, como na maioria das quantificações, junto com o Sujeito 2, que nas Seções 4.1.7 e 4.2.2 também esteve neste grupo. A variação



Figura 4.92.: Variação percentual para o sujeito que seguiu o padrão contrário de variação para o NAA. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.93.: Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.94.: Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão contrário de variação para NAAG. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.95.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.96.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base.

média dos sujeitos, para o NAA e NAAG, juntamente com as barras do desvio padrão correspondentes, estão mostradas nas Figuras 4.95 e 4.96, respectivamente. Embora o desvio padrão seja grande, a variação média dos sujeitos é significativa, principalmente para o NAAG. A SNR encontrada foi maior que 3 para o NAA e para o NAAG, com exceção dos seguintes pontos temporais, cuja SNR esteve entre 1,5 e 2,5: quarto ponto do Sujeito 4 para o NAA, segundo e terceiro pontos do Sujeito 2 e do quarto ao sétimo pontos do Sujeito 11 para o NAAG.

Como as Figuras 4.97 e 4.98 mostram, os dois resultados do Sujeito 1 (NAA) e do Sujeito 7 (NAAG) concordam em padrão de variação, com pequena diferença nos valores percentuais.

De acordo com os testes estatísticos, os resultados apresentados são significantes.

4.2.6. Análise através da altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto

Usando a quarta tentativa de linha de base, a altura dos picos de NAA e NAAG dos espectros absolutos⁷ também foi calculada. Como será mostrado abaixo, os resultados não concordaram (pelo menos a maioria) com os obtidos anteriormente. Isto porém, não

⁷Nesta análise foi usada a média entre os pontos iniciais e finais do espectro para contruir a linha de base, tanto para o NAA quanto para o NAAG.



Figura 4.97.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.98.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Altura do pico – Quarta linha de base.



Figura 4.99.: Variação percentual para os 8 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.

era totalmente inesperado, uma vez que o espectro absoluto possui uma linha de base que não é horizontal (Figura 4.38) (diferente dos espectros reais), e a linha de base contruída estava no eixo horizontal. Esses resultados, portanto, não são muito confiáveis e nem a quantificação é muito robusta, pois a linha de base não acompanha a linha do espectro.

Oito (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo (entre -4% e -52%, Figura 4.99) e onze seguiram o padrão contrário (entre 4% e 62%, Figura 4.100). Cinco (de 18) seguiram o padrão de aumento do NAAG durante o estímulo (entre 2% e 7%, Figura 4.101) e treze seguiram o padrão de decréscimo do metabólito (entre -3% e -33%, Figura 4.102). Tais resultados são contrários aos obtidos até então, onde para o NAA os sujeitos de números 12 à 20 continuaram no mesmo grupo em que se econtravam na maioria das aquisições (Grupo 2 para o Sujeito 20 e Grupo 1 para os demais), com exceção da quantificação feita através da área sob o pico do espectro absoluto (Seção 4.1.9), onde os Sujeitos de 1 à 9 e 11 estiveram também no Grupo 2. O mesmo acontece para o NAAG, cujos sujeitos que nesta análise estiveram no Grupo 1 (Sujeitos 2, 5, 8, 11 e 14) são os que se enquadraram no Grupo 2 em diversas quantificações anteriores (Tabela 4.2). Estes resultados indicam que a linha de base escolhida não deve ser adequada para a quantificação do espectro absoluto, como se imaginava desde o início desta análise.

A variação média dos sujeitos dos Grupos 1 e 2, para o NAA, está mostrada nas Figuras 4.103 e 4.104, respectivamente. Em ambos os casos o desvio padrão é grande,



Figura 4.100.: Variação percentual para os 11 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.101.: Variação percentual para os 5 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.102.: Variação percentual para os 13 sujeitos que seguiram o padrão contrário de variação para NAAG. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.103.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.104.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.105.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de diminuição de NAAG durante o estímulo. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.


Figura 4.106.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.107.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Altura do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.108.: Variação percentual para os 14 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base.

portanto não se pode afirmar que este resultado inspira confiança com relação à distribuição dos valores percentuais dos sujeitos. O mesmo não ocorre para o Grupo 2 no caso no NAAG (Figura 4.105), onde apesar do desvio padrão grande, pode-se afirmar que o grupo apresenta variação negativa de NAAG (mesmo não sendo grande esta variação). A SNR encontrada foi maior que 30 para o NAA e 21 para o NAAG. Apesar da variação contrária obtida para o Sujeito 1 no caso do NAA e do Sujeito 7 para o NAAG, seu outro conjunto de dados (Sujeito 21 em ambos os casos) acompanhou esta variação, como pode ser visto nas Figuras 4.106 e 4.107.

Os testes estatísticos indicaram que são significantes apenas os resultados correspondentes ao segundo ponto temporal do experimento de NAA, e do terceiro ao oitavo pontos do experimento de NAAG.

4.2.7. Análise através da área sob o pico – Quarta linha de base

Utilizando a mesma linha de base da Seção 4.2.6, a área sob os picos de NAA e NAAG em torno de 2,5ppm foi calculada. Quatorze (de 19) sujeitos seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo (entre -8% e -109%, Figura 4.108), enquanto quatro sujeitos seguiram o padrão contrário (entre 28% e 239%, Figura 4.109). A variação percentual média dos sujeitos do Grupo 1 com as barras de desvio padrão correspondentes está mostrada na Figura 4.110, onde vê-se que ela seguiu o mesmo padrão de decréscimo para



Figura 4.109.: Variação percentual dos 5 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base.



Figura 4.110.: Variação percentual média dos sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base.



Figura 4.111.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Area sob o pico – Quarta linha de base.

as duas aquisições do Sujeito 1. De acordo com os testes estatísticos os únicos resultados significantes foram os correspondentes ao quinto e ao sexto pontos temporais.

Para o NAAG o cálculo da área não forneceu resultados confiáveis, pois novamente foram encontrados valores percentuais maiores que 1000% para vários sujeitos, tanto usando a linha de base da Seção 4.2.5 para o experimento de NAAG, quanto a da Seção 4.2.6. Como comentado nas Seções 4.1.7 e 4.2.3, esses valores tão altos não são confiáveis pois uma simples inspeção visual dos espectros bastaria para identificar variações de tal magnitude, mas observando os mesmos, verifica-se que não é o caso.

4.2.8. Análise através da área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto

Por fim, foi realizada a quantificação da área sob o pico de NAA e NAAG do espectro absoluto com a mesma linha de base que foi utilizada na Seção 4.2.6. Este resultado, conforme já dito antes (Seção 4.2.6), não é muito confiável e nem robusto, portanto será mostrado aqui apenas com o intuito de comparar os resultados com os obtidos nas Seções 4.1.9 e 4.2.6.

Quatro sujeitos seguiram um padrão de variação com decréscimo de NAA durante o período de estímulo (entre -3% e -57%, Figura 4.112) e quinze sujeitos seguiram o



Figura 4.112.: Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.113.: Variação percentual dos 15 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAA durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.114.: Variação percentual para os 4 sujeitos que seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.115.: Variação percentual dos 14 sujeitos que seguiram o padrão de decréscimo de NAAG durante o estímulo. Área sob o pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.116.: Variação percentual do NAA para os dois conjuntos de dados do Sujeito 1. Area do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.



Figura 4.117.: Variação percentual do NAAG para os dois conjuntos de dados do Sujeito 7. Area do pico – Quarta linha de base – Espectro absoluto.

padrão contrário (com aumento de NAA entre 9% e 110%, Figura 4.113). Esses resultados concordam com os obtidos na Seção 4.1.9, pois os mesmos sujeitos foram agrupados da mesma maneira nos dois casos e também apresentaram quase o mesmo intervalo de variação; concordam também com os resultados da Seção 4.2.6, com exceção dos Sujeitos 12, 16 e 19, que naquela seção estavam em outro grupo e concordam de maneira parecida com a faixa de variação daquela seção. Os testes estatísticos utilizados forneceram um valor p > 0.05 para quase todos os pontos temporais, com exceção do segundo, terceiro e quarto pontos (semelhante ao calculado na Seção 4.1.9). Para o NAAG, quatro sujeitos seguiram o mesmo padrão de aumento do metabólito durante o estímulo (entre 3% e 9%, Figura 4.114), enquanto quatorze sujeitos seguiram o padrão contrário (entre -6% e -69%, Figura 4.115). Tais resultados concordam com os das Secões 4.1.9 e 4.2.6, pois os mesmos sujeitos estão contidos nos mesmos grupos nestas três seções (com exceção do Sujeito 11 na Seção 4.2.6, que está no Grupo 2). Os intervalos de variação percentual também são parecidos, especialmente os correspondentes ao Grupo 1, para estas três seções. Obteve-se com os testes estatísticos que os resultados são significantes, o que também concorda com o valor da Seção 4.1.9.

As Figuras 4.116 e 4.117 mostram as variações percentuais para os dois conjuntos de dados dos Sujeitos 1, para o caso do NAA e 7, para o caso do NAAG, respectivamente.

4.2.9. Resumo dos resultados obtidos

Será apresentado aqui um resumo dos resultados apresentados nesse segundo conjunto de análises.

A Tabela 4.4 mostra o agrupamento dos sujeitos nas diferentes quantificações feitas, para o experimento de NAA⁸. Os Sujeitos 14, 15 e 17 se enquadraram no Grupo 1 em todas as quantificações, enquanto os Sujeitos 13 e 20 estiveram no mesmo grupo em sete das oito análises (Sujeito 13 no Grupo 1 e Sujeito 20 no Grupo 2). Os Sujeitos 2, 9, 12, 16, 18 e 19 apresentaram o mesmo padrão de variação (diminuição de NAA) em seis das oito análises, enquanto os Sujeitos 1, 3, 6, 7, 8 e 11 se enquadram no mesmo grupo (Grupo 2 para o Sujeito 11 e Grupo 1 para os demais) em cinco das oito quantificações. Os Sujeitos 4 e 5 estiveram metade das análises no Grupo 1 e a outra metade no Grupo 2. Os dois conjuntos de dados do Sujeito 1 concordaram em padrão de variação em cinco das oito análises.

⁸Os resultados usando a quarta linha de base (Seção 4.2.5) são muito parecidos com os apresentados na Seção 4.2.4, portanto estes últimos não serão mostrados.

Tabela 4.4.: Agrupamento dos sujeitos para as diferentes quantificações realizadas para o NAA. Os números 1 e 2 se referem aos grupos nos quais os sujeitos se enquadraram, conforme foi explicado no início deste capítulo.

NAA				
Sujeitos	Altura do pico	Altura do pico	Área sob o pico	Área sob o pico
	3a. linha de base	3a. linha de base	3a. linha de base	Sem linha de base
		Espectro absoluto		
1	2	2	2	1
2	1	1	1	1
3	1	1	2	1
4	1	1	1	2
5	2	1	2	1
6	1	1	2	1
7	1	1	1	1
8	1	1	1	2
9	1	1	1	1
10	excluído	excluído	excluído	excluído
11	1	1	2	2
12	1	1	2	1
13	1	1	2	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	2	1
17	1	1	1	1
18	1	1	2	1
19	1	1	2	1
20	2	1	2	2
21	1	1	1	1

NAA

Sujeitos	Altura do pico	Altura do pico	Área sob o pico	Área sob o pico
~	4a. linha de base			
		Espectro absoluto		Espectro absoluto
		-		-
1	1	2	1	2
2	1	2	1	2
3	1	2	1	2
4	1	2	2	2
5	1	2	1	2
6	1	2	1	2
7	1	2	2	2
8	1	2	1	2
9	1	2	1	2
10	excluído	excluído	excluído	excluído
11	1	2	2	2
12	1	1	1	2
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	2
17	1	1	1	1
18	1	1	1	2
19	1	1	1	2
20	2	2	2	2
21	1	2	1	2

Tabela 4.5.:	Agrupamento	dos sujeitos p	oara as	diferente	\mathbf{s} quantific	ações re	ealizadas pa	ra o	NAAG.
	Os números 1 e	e 2 se referem	aos gru	ipos nos q	uais os suj	eitos se	enquadrara	m, co	onforme
	foi explicado n	o início deste	e capíti	ılo.					

Altura do pico	Altura do pico	Área sob o pico	Área sob o pico
3a. linha de base	3a. linha de base	3a. linha de base	Sem linha de base
	Espectro absoluto		
1	1	-	-
1	2	-	-
1	1	-	-
excluído	excluído	-	-
2	2	-	-
excluído	excluído	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
2	2	-	-
1	1	-	-
1	2	-	-
2	2	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
1	1	-	-
1	2	-	-
1	1	-	-
1	2	-	-
	Altura do pico 3a. linha de base	Altura do pico Altura do pico 3a. linha de base 3a. linha de base 1 3a. linha de base 1 1 1 1 1 2 1 1 1 2 1 1 excluído excluído 2 2 excluído excluído 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 1 1 1 1 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 <tr td=""> 1 <td< td=""><td>Altura do pico Área sob o pico 3a. linha de base Sa. linha de base 3a. linha de base Sa. linha de base Espectro absoluto - 1 1 - 1 1 - 1 2 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 2 2 - excluído excluído - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1<</td></td<></tr>	Altura do pico Área sob o pico 3a. linha de base Sa. linha de base 3a. linha de base Sa. linha de base Espectro absoluto - 1 1 - 1 1 - 1 2 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 2 2 - excluído excluído - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1<
Altura do pico Área sob o pico 3a. linha de base Sa. linha de base 3a. linha de base Sa. linha de base Espectro absoluto - 1 1 - 1 1 - 1 2 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 2 2 - excluído excluído - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1 1 - 1<			

NAAG

Sujeitos	Altura do pico 4a. linha de base	Altura do pico 4a. linha de base Espectro absoluto	Área sob o pico 4a. linha de base	Área sob o pico 4a. linha de base Espectro absoluto
1	1	2	-	2
2	2	1	-	1
3	1	2	-	2
4	excluído	excluído	-	excluído
5	2	1	-	1
6	excluído	excluído	-	excluído
7	1	2	-	2
8	2	1	-	2
9	1	2	-	2
10	1	2	-	2
11	2	1	-	1
12	1	2	-	2
13	1	2	-	2
14	1	1	-	1
15	1	2	-	2
16	1	2	-	2
17	1	2	-	2
18	1	2	-	2
19	1	2	-	2
20	1	2	-	2
21	1	2	-	2

A Tabela 4.5 mostra o agrupamento dos sujeitos nas diferentes quantificações realizadas para o NAAG. Os Sujeitos 1, 2, 3, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 e 20 estiveram no mesmo Grupo 1 em três das cinco análises, enquanto que os Sujeitos 5, 7, 11, 13 e 19 estiveram no Grupo 2 o mesmo número de quantificações. Os dois conjuntos de resultados do Sujeito 7 concordaram em quatro das cinco quantificações.

Em suma, quatorze (de 19) sujeitos seguiram o padrão de diminuição de NAA durante o estímulo (em pelo menos cinco das oito análises) e treze (de 18) seguiram o padrão de aumento de NAAG durante o estímulo (em pelo menos três das cinco análises). A Tabela 4.6 mostra a faixa de valores percentuais de variação de NAA e NAAG para as diferentes análises tratadas nas Tabelas 4.4 e 4.5. Pode-se ver que as faixas de valores percentuais, nas quais as variações dos sujeitos estão contidas, são relativamente próximas para o caso do Grupo 1, tanto para o NAA quanto para o NAAG, com exceção da quarta análise para o NAA, cujo valor final foi quase (ou mais) que o dobro dos valores mostrados para sete das outras quantificações e das duas últimas análises mostradas para o NAAG, cuja faixa de variação foi bem pequena (porém estas são as quantificações não são muito confiáveis, pelos motivos já apresentados). Já para o Grupo 2 as faixas de variação tem diferenças maiores entre as análises.

Tabela	4.6.:	Intervalo	de	variações	percentuais	dos	sujeitos	para	cada	padrão	de	variação	do	NAA
		e do NA.	AG	•										

NAA				
Grupo	Altura do pico 3a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base Espectro absoluto	Área sob o pico 3a. linha de base	Área sob o pico Sem linha de base
$\frac{1}{2}$	$-4\%60\% \ 5\% - 16\%$	-10%54% 16%	$\frac{-18\%74\%}{8\% - 173\%}$	-19%133% 22% - 128%
Grupo	Altura do pico 4a. linha de base	Altura do pico 4a. linha de base Espectro absoluto	Área sob o pico 4a. linha de base	Área sob o pico 4a. linha de base Espectro absoluto
1 2	-7%77% 9%	-4%52% 4% - 62%	-8%109% 28% - 239%	-3%57% 9% - 110%

NAAG

Grupo	Altura do pico 3a. linha de base	Altura do pico 3a. linha de base Espectro absoluto	Área sob o pico 3a. linha de base	Área sob o pico Sem linha de base
1	14%-150%	17%-126%	-	-
2	- 24% – - 38%	-19 $\%$ – -31 $\%$	-	-
Grupo	Altura do pico	Altura do pico	Área sob o pico	Área sob o pico
	4a. linha de base	4a. linha de base	4a. linha de base	4a. linha de base
		Espectro absoluto		Espectro absoluto
1	26%-172%	2%-7%	_	3%-9%
2	-7%113%	-3 $\%$ – -33 $\%$	-	-6 $\%$ – -69 $\%$

4.3. Quantificação dos espectros não editados

Visando deixar a análise mais robusta, foi calculada a variação dos picos NAA de NAAG dos espectros não editados. Para isso, foi utilizada a metodologia da Seção 4.2 mas com algumas modificações no pré-processamento: não foi usada a apodização e os espectros pares foram somados aos ímpares, de forma que no espectro resultante existisse um pico em 2ppm. Feito isso, o pico em 2ppm foi quantificado para os experimentos de NAA e NAAG de duas maneiras diferentes: com o MATLAB e com o LCModel. Com o primeiro, calculamos a altura do pico em 2ppm para o espectro real e para o absoluto.

4.3.1. Quantificação com o MATLAB



Figura 4.118.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para 18 sujeitos do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro real.

A altura do pico foi calculada em 2ppm para o espectro real e para o espectro absoluto, nos experimentos de NAA e NAAG, com o intuito de comparar as variações da altura do pico em 2ppm com as variações dos picos de NAA e NAAG encontradas anteriormente. Aqui foi usada a mesma linha de base usada na Seção 4.2.5, para os espectros do experimento de NAA, e a linha de base da Seção 4.2.6 para os espectros do experimento de NAAG. Como os resultados mostram (Figuras 4.118, 4.119, 4.120, 4.121, 4.122 e 4.123), apesar das variações percentuais para os espectros reais serem quase idênticas as variações dos espectros absolutos, elas não seguem um padrão de forma que seja possível agrupá-las de



Figura 4.119.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para os Sujeitos 4 e 15 do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro real.



Figura 4.120.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para 20 sujeitos do experimento de NAAG. Quantificação com o MATLAB – Espectro real.



Figura 4.121.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para 18 sujeitos do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro absoluto.



Figura 4.122.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para os Sujeitos 4 e 15 do experimento de NAA. Quantificação com o MATLAB – Espectro absoluto.



Figura 4.123.: Variação percentual do pico de NAA+NAAG em 2ppm para 20 sujeitos do experimento de NAAG. Quantificação com o MATLAB – Espectro absoluto.

maneira satisfatória. E de acordo com os testes estatísticos as variações encontradas não são significantes (p > 0,1 para a maioria dos pontos temporais, exceção apenas para o sexto e sétimo pontos usando os espectros absolutos do experimento de NAA).

4.3.2. Quantificação com o LCModel

Como última forma de quantificação dos espectros não editados, foi usado o LCModel [8]. Os resultados para o experimento de NAA são mostrados nas Figuras 4.124, 4.125, 4.126, 4.127 e 4.128. Um único sujeito é mostrado para a quantificação de NAAG porque seus resultados foram os únicos que apresentaram CRB < 20%. Os resultados para o experimento do NAAG são mostrados nas Figuras 4.129, 4.130, 4.131 e 4.132. Obteve-se p > 0,1 para todos os pontos temporais, dos dois experimentos, com exceção apenas do quarto ponto para a variação de NAA+NAAG do experimento de NAA. Portanto, com esta quantificação não é possível afirmar que o NAA e o NAAG variaram durante o estímulo. Os resultados aqui encontrados são semelhantes aos da Seção 4.3.1.

Das duas quantificações feitas nesta Seção 4.3, nenhuma apresentou resultados estatisticamente significantes, portanto, baseado nestas, nada se pode afirmar sobre a variação do NAA e do NAAG.



Figura 4.124.: Variação percentual do NAA para 18 sujeitos do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA.



Figura 4.125.: Variação percentual do NAA para os Sujeitos 4 e 15 do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA.



Figura 4.126.: Variação percentual do NAAG para o Sujeito 13 do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA.



Figura 4.127.: Variação percentual do NAA+NAAG para 17 sujeitos do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA.



Figura 4.128.: Variação percentual do NAA+NAAG para os Sujeitos 4, 12 e 15 do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAA.



Figura 4.129.: Variação percentual do NAA para 18 sujeitos do experimento de NAA. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG.



Figura 4.130.: Variação percentual do NAA para os Sujeitos 4 e 10 do experimento de NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG.



Figura 4.131.: Variação percentual do NAA+NAAG para 17 sujeitos do experimento de NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG.



Figura 4.132.: Variação percentual do NAA+NAAG para os Sujeitos 2, 4 e 10 do experimento de NAAG. Quantificação com o LCModel – Experimento de NAAG.

5 Discussões

Neste trabalho foram realizadas diversas formas de análise, descritas no Capítulo 4, que estão mostradas de maneira resumida e esquemática na Figura 5.1. Estas metodologias podem ser divididas nas análises feitas dos espectros editados, e nas feitas dos espectros não editados, ou seja, aqueles em que os espectros pares e ímpares obtidos com a sequência MEGA-PRESS foram somados, ao invés de subtraídos.



Figura 5.1.: Resumo esquemático das análises feitas no Capítulo 4.

Para as quantificações dos espectros editados (Seções 4.1 e 4.2) os resultados podem ser organizados em dois grupos: um no qual as variações de NAA e NAAG foram estatisticamente significantes (pelo menos em alguns dos pontos temporais), e outro no qual estas variações não mostraram significância estatística. No primeiro grupo se enquadram as quantificações feitas nas Seções 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7 (segundo, terceiro e quarto pontos temporais para o experimento de NAA sem usar a linha de base), 4.1.8, 4.1.9 (segundo ponto temporal para o NAA, todos os pontos do experimento de NAAG), 4.2.1, 4.2.2 (todos os pontos do experimento de NAA, segundo ao quinto e do sétimo ao oitavo ponto do experimento de NAAG), 4.2.3 (do quarto ao nono ponto do experimento de NAA sem usar linha de base), 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6 (segundo ponto do experimento de NAA, do terceiro ao oitavo ponto do experimento de NAAG), 4.2.7 (quinto e sexto pontos do experimento de NAA) e 4.2.8 (do segundo ao quarto ponto do experimento de NAA, todos os pontos do experimento de NAAG). Já no segundo grupo estão as quantificações feitas nas Seções 4.1.7 (todos os pontos do experimento de NAA usando terceira linha de base, quinto ponto para o experimento do NAA sem usar linha de base, NAAG sem usar linha de base), 4.1.9 (do terceiro ao quinto ponto do experimento de NAA), 4.2.2 (sexto e nono ponto do experimento de NAAG), 4.2.3 (todos os pontos do experimento de NAA usando a terceria linha de base, segundo e terceiro ponto do experimento de NAA sem usar linha de base), 4.2.6 (do terceiro ao nono ponto do experimento de NAA, segundo e nono pontos do experimento de NAAG), 4.2.7 (do segundo ao quarto e do sétimo ao nono ponto do experimento de NAA) e 4.2.8 (do quinto ao nono ponto do experimento de NAA). Considerando os resultados não significantes, nada se pode afirmar sobre a variação correspondente dos metabólitos.

Para os espectros editados, dois diferentes métodos de pré-processamento foram utilizados, sendo o mais robusto o utilizado na Seção 4.2 (que fornece nove pontos temporais), pois dá uma informação mais detalhada sobre a forma de variação dos metabólitos durante o paradigma.

Ainda para os espectros editados, duas quantificações principais foram testadas: 1) calculando a área sob o pico e 2) calculando a altura do pico. O cálculo da área, apesar de ser proporcional à concentração do metabólito [21], possui dois problemas principais: a dificuldade em se determinar com segurança o início e final do pico e a instabilidade da base do pico, cujo ruído pode influenciar de maneira prejudicial o cálculo da área. A quantificação pela altura elimina o primeiro problema (de determinação de limites do pico, já que a determinação do máximo do pico é direta), e embora possua o mesmo problema de instabilidade da linha de base, este fica atenuado devido a se tratar de um único ponto,

o que torna este resultado mais reprodutível, como já mencionado. Com isso, o cálculo utilizando a altura do pico é o mais confiável para se efetuar. E embora a altura não seja diretamente proporcional à concentração dos metabólitos, ainda assim ela pode dar um indicativo da variação dos mesmos.

Quanto ao uso do espectro real ou absoluto é preferível o uso do espectro real. Isso porque, novamente, nem o cálculo da área ou da altura usando o espectro absoluto possuem relação direta com a concentração dos metabólitos. Além disso, a linha de base dos espectros absolutos é bem mais distorcida que a dos espectros reais (ela sobe mais acentuadamente à esquerda dos picos de interesse devido ao resíduo do pico da água), o que dificulta sua determinação.

A linha de base é uma etapa importante para se levar em conta, em alguns casos por necessidade (NAAG) e em outros apenas por segurança (NAA). Das quatro tentativas de linha de base, a que se mostrou mais robusta foi a terceira (Seção 4.2.1), pois esta foi uma melhoria das duas primeiras, e quando comparada com a quarta (compare as Figuras 4.54 e 4.55 com as Figuras 4.89 e 4.90), apresentou um ajuste melhor à linha do espectro.

Levando-se em conta os dois pré-processamentos utilizados, os quatro testes de linha de base, as duas diferentes formas de quantificação e os dois tipos de espectros analisados, conclui-se que a quantificação mais confiável foi a realizada na Seção 4.2.1, que utilizou nove pontos temporais, a altura do espectro real e a terceira estimativa de linha de base. Para esta quantificação, doze sujeitos (Sujeitos 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18 e 19) seguiram ambos os padrões de decréscimo de NAA e aumento de NAAG¹. Estes indivíduos tiveram em média uma diminuição máxima de $-18\% \pm 17\%^2$ para o NAA e aumento máximo de $64\% \pm 43\%$ para o NAAG durante o estímulo, retornando para $-12\% \pm 18\%$ (NAA) e $44\% \pm 36\%$ (NAAG) no final do paradigma. A razão NAAG/NAA para estes sujeitos esteve entre 1 e 12 (valor médio = 7) para a variação máxima durante o estímulo, e entre 1 e 37 no final do paradigma (valor médio = 12).

Já no caso dos espectros não editados, dois tipos de quantificações foram feitas. A primeira, utilizando o LCModel, que ajusta o espectro com combinações de espectros individuais de cada metabólito, permitiu a avaliação da variação da soma de NAA e NAAG, e também da variação de NAA isolado, mas os resultados relativos à variação de NAAG iso-

¹No total, dezesseis sujeitos seguiram somente o padrão de decrésicmo de NAA e quinze seguiram somente o padrão de aumento de NAAG.

²Esta incerteza é o desvio padrão dos valores da variação percentual para os sujeitos que seguiram ambos os padrões de diminuição de NAA e aumento de NAAG.

lado tiveram um erro muito grande e foram descartados. A segunda quantificação consistiu na medida da altura do pico no espectro real, mas desta vez, do pico em 2ppm correspondente à soma NAA+NAAG. Ambas quantificações foram feitas utilizando os espectros correspondentes aos 9 pontos temporais. Os resultados do LCModel para NAA+NAAG e da estimativa da altura do pico de NAA+NAAG em 2ppm foram equivalentes: ambos deram não significantes, o que significa que não há evidências para considerar que a soma destes metabólitos variou ao longo do experimento, ou seja, acompanhando o estímulo. É interessante notar que estes resultados não discordam dos resultados obtidos com os espectros editados, embora, como será discutido adiante, não se sabe ao certo qual a relação entre as variações de NAA e NAAG. Por outro lado, os resultados obtidos com o LCModel para a variação do NAA isolado, que também não foram significantes, discordam dos resultados encontrados com os espectros editados. Supondo que os resultados dos espectros editados estejam corretos, uma possível explicação para os resultados não significantes do LCModel pode ser o fato de que na verdade, ao somar os espectros pares e ímpares da sequência MEGA-PRESS, o resultado é que o pico em 2ppm aumentou de tamanho, mas não os correpondentes ao NAA e ao NAAG nas regiões de 4,5ppm e 2,5 ppm, cujos picos haviam sido suprimidos em um dos dois conjuntos de espectros. Embora estes picos sejam bem menores que aquele em 2ppm, esta é uma possível fonte de erro para o LCModel, que analisa todos os picos conjuntamente.

Em suma, os resultados encontrados com a análise dos espectros editados, e que não foram refutados com a análise dos espectros não editados, apontam para uma variação de ambos NAA e NAAG durante o estímulo, com descréscimo do primeiro e aumento do segundo. Estes resultados vão de encontro à atual discussão na literatura sobre a variação destes metabólitos (Seção 2.4). Eles concordam com os resultados de Baslow *et al.* [12] e Sarchielli *et al.* [13], que reportaram decréscimo de NAA durante o estímulo (-13% e -7%, respectivamente). Porém, deve ser lembrado que ambos os trabalhos mediram a variação conjunta de NAA+NAAG, enquanto que a metodologia aqui apresentada permitiu separar a contribuição destes metabólitos. Os resultados aqui apresentados concordam também com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo [11] (que foram encontrados fazendo a média dos espectros entre os sujeitos e quantificando com o LCModel), cuja variação foi semelhante (-20%). A discordância entre os resultados do LCModel para o NAA isolado, aqui apresentados, e os encontrados em [11], pode ser explicada pelo fato da soma dos espectros pares com os correspondentes ímpares, feita na Seção 4.3, ter aumentado os picos de NAA e NAAG em torno de 2ppm, 2,5ppm e 4,5ppm de forma não proporcional, o que é, como discutido acima, uma possível fonte de erro para a quantificação com o LCModel.

Os resultados cuja variação foi estatisticamente significante podem ter as seguintes explicações. A primeira é que a forma do pico de NAA muda devido ao efeito BOLD [37], com o estreitamento da largura do pico e aumento de sua amplitude, o que causaria variação da altura do pico mas sem implicar em mudança na concentração do metabólito [14, 37]. Há, porém, alguns pontos que fazem esta explicação ser difícil de se adaptar aos resultados. Primeiro, o efeito BOLD causa uma variação de cerca de 2% [14], enquanto que as variações consideradas como mais confiáveis (Seção 4.2.1) tem uma faixa de variação entre -4% e -60%. Além disso, a altura do pico de NAA deveria aumentar [37], ao passo que aqui diminuiu. Já para o NAAG, até onde se sabe não há medidas para a variação devido ao efeito BOLD, pois em [37] foram feitas medidas apenas para os picos mais proeminentes (água, NAA e creatina).

A segunda explicação é que há realmente um decréscimo nos níveis de NAA, uma vez que ele pode funcionar como uma bomba de água molecular [28, 38]. Durante o estímulo ATP é consumido para restaurar a polarização neuronal e como produto tem-se ADP e fosfato (P). A necessidade por oxigênio aumenta a quantidade de oxihemoglobina no sangue e este oxigênio é usado, juntamente com glicose, para ressintetizar o ATP. Ocorre concomitantemente o aumento dos produtos finais da oxidação da glicose, CO_2 e H_2O , e a produção de NAA e NAAG. Então, ambos NAA e NAAG são lançados para o fluido extracelular, onde o NAA é direcionado aos oligodendrócitos e o NAAG é direcionado para os astrócitos [38]. Nestas células da glia ambas as substâncias são catabolizadas para depois serem ressintetizadas no neurônio. A hidrólise de NAA gera acetato e aspartato, com este último sendo enviado aos neurônios para a ressíntese de NAA. Junto com o efluxo de NAA a água também é carregada e, após a hidrólise de NAA, ela é enviada para o sistema vascular [28, 29].

Como foi encontrado que o NAA diminuiu durante o estímulo, isso significa que a taxa de hidrólise do metabólito é maior que sua taxa de síntese. A concentração de tais substâncias no cérebro, bem como a razão de concentração de NAA/NAAG são difíceis de se determinar, mesmo porque nem todo NAA é transformado em NAAG. Mesmo assim, a única forma conhecida para a síntese de NAAG é através do NAA, portanto um aumento no primeiro é causado pela ressíntese do último. A razão de variação NAAG/NAA calculada durante o estímulo está entre 1 e 12, o que significa que a diferença entre a taxa de síntese de NAAG e sua taxa de hidrólise (valor igual ao aumento percentual encontrado, i.e., na média, 64%) é de 1 a 12 vezes maior que a diferença entre a taxa de hidrólise do

NAA e sua taxa de síntese (valor igual à diminuição percentual encontrada, i.e, na média, 18%). Considerando-se a razão de 49:1 (NAA:NAAG) reportado por Battistuta para o córtex visual de ratos³ [39] e a concentração de aproximadamente 10mM para o NAA no cérebro [12], a concentração de NAAG seria em torno de 0,2mM. Durante o estímulo, uma variação de -18% para o NAA significa uma diminuição de 1,8mM em sua concentração, ao passo que uma variação de 64% para o NAAG significa que o nível deste metabólito aumenta 0,13mM. Como resultado, as concentrações dos metabólitos durante o estímulo iriam para 8,2mM (NAA) e 0,33mM (NAAG), com a proporção de NAA:NAAG chegando ao valor de 25:1. Ao final do paradigma as concentrações seriam de 8,8mM (para uma diminuição de -12% para o NAA) e 0,29mM (para um aumento de 44% para o NAAG), com a proporção de 30:1 (NAA:NAAG). Contudo, é importante lembrar que como foi considerada a quantificação através da altura do pico, ao invés de sua área, as razões encontradas não refletem com acurácia a razão da concentração dos metabólitos. Além disso, não conhecemos estudos que reportem a concentração proporcional de NAA e NAAG no córtex visual de humanos, portanto um conhecimento melhor da concentração destes metabólitos é necessário para o entendimento completo da diminuição de NAA e do aumento de NAAG encontrado. Por último, a variação de NAAG concorda com o fato de que este metabólito é um neuropeptídeo que é liberado nas sinapses e atua como modulador para a liberação de alguns neurotransmissores [30] e também concorda com modelos para o metabolismo energético que apontam para este metabólito como relacionado à resposta hiperêmica vascular que causa o sinal BOLD [7, 28].

 $^{^{3}\}mathrm{At\acute{e}}$ on de sabemos não há experimentos que calcularam esta razão para o córtex visual de humanos.

6

Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho buscou-se elucidar a controvérsia existente na literatura relativa à variação do metabólito NAA no córtex occipital durante experimentos de estimulação visual. Para isso, utilizou-se a sequência de pulsos MEGA-PRESS, de edição de espectros, em um experimento de MRS funcional, com o objetivo de obter medidas separadas de NAA e seu derivado NAAG, cujos picos se sobrepõem em espectros cerebrais de MRS. Até onde sabemos, esta foi a primeira vez em que tal sequência foi utilizada num experimento desta natureza.

Uma vez obtidos os dados, foi desenvolvida uma metodologia de pré-processamento dos mesmos, seguida pela aplicação de uma série de métodos de análise/quantificação. Um estudo piloto confirmou que os picos editados com a MEGA-PRESS (aqueles de NAA/NAAG em $\sim 2,5$ ppm) não possuíam as formas padrões (gaussiana ou lorentziana), estando portanto descartados os métodos como AMARES, comumente usados para análise de espectros de MR, que ajustam curvas com esses formatos aos dados. Foram então aplicadas a estes dados editados várias formas mais "cruas" de quantificação, utilizando tanto o espectro real quanto o absoluto, tanto a área sob a curva quanto a altura dos picos, acompanhadas de diversas estimativas da linha de base correspondente. Para finalizar, foi realizada uma quantificação dos dados não-editados, ou seja, da medida conjunta de NAA e NAAG, utilizando tanto o método mais usado para espectros de MR *in vivo*, o LCModel, quanto o método "cru" de estimativa da altura do pico em 2ppm.

As quantificações dos picos editados de NAA e NAAG apontaram para uma diminuição de NAA durante o estímulo e um aumento de NAAG durante o mesmo, com uma tendência, em média, de retornar ao estado basal ao final do paradigma. Já as quantificações dos espectros não editados não mostraram significância estatística relativa à variação conjunta de NAA+NAAG (tanto com o LCModel quanto com a altura do pico) nem de NAA isolado (LCModel).

Como comentado no Capítulo 5, o único resultado realmente discrepante dos demais é o do LCModel relativo à variação de NAA isolado. Os demais resultados, em conjunto, apontam para uma variação de NAA e de NAAG seguindo padrões inversos, e para uma não-variação da soma NAA+NAAG. No entanto, acreditamos que o método usando os espectros editados e analisando os picos em torno de 2,5ppm seja mais robusto que o uso do LCModel. Isso porque o primeiro método consegue separar efetivamente o sinal dos metabólitos, cujos picos são quantificados separadamente, enquanto que com o segundo método não há segurança total de que os ajustes feitos para os espectros de NAA e NAAG sejam os que realmente representam os picos correspondentes, uma vez que eles estão sobrepostos.

Ainda assim, como pode ser visto pelas Figuras 4.52 e 4.53, os espectros editados são bastante ruidosos, portanto, análises complementares podem ser feitas no futuro no sentido de verificar os resultados aqui obtidos. Recentemente, o colaborador deste trabalho, Richard Edden, finalizou o desenvolvimento de um *software* para quantificação de espectros editados de GABA¹, que segundo ele pode ser adaptado para a análise de espectros editados de NAA e NAAG. Seria interessante aplicar esta nova metodologia de análise aos nossos dados e comparar os resultados com os aqui obtidos.

Finalmente, acreditamos que, embora não tenha resolvido absolutamente a controvérsia à qual se propôs, este trabalho foi pioneiro na utilização de sequências de edição espectral em experimentos de fMRS, e contribuiu com o desenvolvimento de métodos de pré-processamento e quantificação para serem utilizados em espectros editados. Embora cada forma de análise possua prós e contras, melhorias podem ser feitas para tornar sua utilização mais robusta, de forma a contribuir para novas pesquisas relacionadas ao NAA e

¹Disponível em http://gabamrs.blogspot.com.br/.

ao NAAG no futuro.



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

Em caso de alguma dúvida, você pode contactar a pesquisadora Gabriela Castellano (tel: 3521 5519, email: gabriela@ifi.unicamp.br), ou pode se referir ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (tel: 3521-8936, email: cep@fcm.unicamp.br).

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

Nome:	
RG:	Assinatura:
Local e data:	
Nome do pesquisador responsável:	
Assinatura do pesquisador responsável:	
Assinatura do posquisador responsaver	
Lista de Publicações

Abaixo estão indicadas as publicações decorrentes do projeto, tanto as diretamente relacionadas com ele, quanto as não diretamente relacionadas, bem como trabalhos que serão publicados e os que estão em preparação.

Publicações relacionadas ao projeto

- Trabalhos apresentados em conferências internacionais:
- LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Investigation of NAA and NAAG dynamics underlying visual stimulation using MEGA-PRESS In: 18th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, 2012, Beijing, China. Proceedings of the 2012 OHBM Annual Meeting, 2012.
- LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Investigation of NAA dynamics underlying visual stimulation using MEGA-PRESS In: ISMRM 20th Annual Meeting, 2012, Melbourne, Austrália. Proceedings of the ISMRM 20th Annual Meeting., 2012.

- Trabalhos apresentados em conferências nacionais:
- LANDIM, R. C. G. ; EDDEN, R. A. E. ; FOERSTER, B. ; LI, L. M. ; COVOLAN, R. J. M. ; CASTELLANO, G. . NAA and NAAG dynamics underlying visual stimulation using fMRS with MEGA-PRESS: improved baseline for peak height estimation. In: VI Workshop CInAPCe, 2012, Campinas. Caderno de Resumos do VI Workshop CInAPCe, 2012. p. 25-25.
- 4. LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Investigation of NAA and NAAG dynamics underlying visual stimulation using MEGA-PRESS in a functional MRS experiment In: XXXV Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2012, Águas de Lindóia. Caderno de resumos do XXXV Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada., 2012.
- LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Processamento de espectros de NAA editados com MEGA-PRESS em experimento de fMRS In: IV Jornada de Neurociências, 2011, Campinas. Anais da IV Jornada de Neurociências (CD-ROM)., 2011. p.18-18
- 6. LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Processing of NAA and NAAG fMR MEGA-PRESS edited spectra In: II Simpósio de Processamento de Sinais da UNICAMP, 2011, Campinas. Caderno de Resumos do II Simpósio de Processamento de Sinais da UNICAMP. 2011.
- Landim, Ricardo C. G., Edden, Richard A. E., Foerster, Bernd, Li, Li M., Covolan, Roberto J. M., Castellano, Gabriela. Processing of NAA and NAAG edited spectra acquired using the MEGA-PRESS sequence In: XI Young Researchers Meeting, Campinas. Physicae Proceedings. , 2012. DOI: 10.5196/physicae.proceedings.XIYRM.1
- LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Processing of NAA and NAAG fMR MEGA-PRESS edited spectra In: V Workshop CInAPCe, 2011, São Paulo. Caderno de resumos do V Workshop CInNAPCe. 2011.
- Outras publicações (não relacionadas diretamente ao projeto)
 - Trabalhos apresentados em conferências internacionais:

- 9. LANDIM, R. ; EDDEN, R. A. E. ; FOERSTER, B. ; COSTA, T. B. S. ; SILVA, E. L. ; LI, L. M. ; COVOLAN, R. J. M. ; CASTELLANO, G. . Preliminary results of GABA dynamics underlying visual stimulation at different frequencies. In: 19th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, 2013, Seattle. Proceedings of the 2013 OHBM Annual Meeting, 2013.
- LANDIM, R. C. G.; EDDEN, R. A. E.; FOERSTER, B.; COSTA, T. B. S.; SILVA, E. L.; LI, L. M.; COVOLAN, R. J. M.; CASTELLANO, G. Brain GABA response to visual stimulation at different frequencies. In: I Congreso FALAN, 2012, Cancun. I Congreso FALAN - Abstracts, 2012. p. 256-256.
- BARRETO, F. R., SALMON, C. E. G., COSTA, T. B. S., LANDIM, R. C. G., CASTELLANO, G. Dynamic 31P-MRS during Visual Stimulation Protocols in healthy young adult subjects. In: 18th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, 2012, Beijing, China. Proceedings of the 2012 OHBM Annual Meeting. 2012.
- 12. BARRETO, F. R., SALMON, C. E. G., COSTA, T. B. S., LANDIM, R. C. G., CASTELLANO, G. Dynamic 31P-MRS during visual stimulation protocols in healthy young adult subjects. In: ISMRM 20th Annual Meeting, 2012, Melbourne, Austrália. Proceedings of the ISMRM 20th Annual Meeting., 2012
- CAMPOS, L. S., LANDIM, R. C. G., MENELI, T. D., CASTELLANO, G., AMATO FILHO, A. C., PIOVESANA, L. G., CENDES, F., DABREU, A. Cerebellar Metabolic Alterations in Parkinson's Disease In: 64th American Academy of Neurology Annual Meeting, 2012, New Orleans, EUA. Neurology., 2012. v.78. p.1210 - 1210.
- PIOVESANA, L. G., CAMPOS, L. S., TORRES, F., CENDES, F., LOPES-CENDES, I., CASTELLANO, G., MENELI, T. D., LANDIM, R. C. G., AMATO FILHO, A. C., DABREU, A. Multimodal Neuroimaging Study of the Cerebellum in Primary Cervical Dystonia In: 64th American Academy of Neurology Annual Meeting, 2012, New Orleans, EUA. Neurology. , 2012. v.78. p.1216 - 1216.
- Trabalhos apresentados em conferências nacionais:
- LANDIM, R. C. G.; EDDEN, R. A. E.; FOERSTER, B.; COSTA, T. B. S.; SILVA,
 E. L.; LI, L. M.; COVOLAN, R. J. M.; CASTELLANO, G. . GABA dynamics

underlying visual stimulation at different frequencies. In: VI Workshop CInAPCe, 2012, Campinas. Caderno de Resumos do VI Workshop CInAPCe, 2012. p. 27-27.

- COSTA, T. B. S.; FOERSTER, B.; LANDIM, R. C. G.; SILVA, E. L.; COVOLAN, R. J. M.; CASTELLANO, G. Metabolic changes underlying visual stimulation at different frequencies: a 31P-fMRS study. In: VI Workshop CInAPCe, 2012, Campinas. Caderno de Resumos do VI Workshop CInAPCe, 2012. p. 39-39.
- 17. COSTA, T. B. S. ; LANDIM, R. C. G. ; SILVA, E. L. ; BARRETO, F. R. ; SALMON, C. E. G. ; COVOLAN, R. J. M. ; CASTELLANO, G. . Variações metabólicas no cérebro humano devido a estímulo visual dependente da frequência: um estudo usando 31P-MRS. In: XX Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2012, Campinas. Caderno de Resumos do XX Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2012. p. 159-160.
- BARRETO, F. R., LANDIM, R. C. G., COSTA, T. B. S., SILVA, E. L., CASTEL-LANO, G., SALMON, C. E. G. Detection of Metabolic changes in Human Visual Cortex caused by Photic Stimulation using 31P-MRS In: V Workshop CInAPCe, 2011, São Paulo. Caderno de resumos do V Workshop CInNAPCe., 2011.
- COSTA, T. B. S., LANDIM, R. C. G., SILVA, E. L., BARRETO, F. R., SALMON, C. E. G., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Variações metabólicas no cérebro humano devido a estímulo visual dependente da frequência: um estudo piloto usando 31P-MRS In: IV Jornada de Neurociências, 2011, Campinas. Anais da IV Jornada de Neurociências., 2011. p.8 - 8
- 20. COSTA, T. B. S., LANDIM, R. C. G., SILVA, E. L., BARRETO, F. R., SALMON, C. E. G., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Visual stimuli frequency dependence of metabolite changes in the human brain: a pilot study using 31P-MRS In: V Workshop CInAPCe, 2011, São Paulo. Caderno de resumos do V Workshop CInNAPCe., 2011.
- 21. COSTA, T. B. S., LANDIM, R. C. G., SILVA, E. L., BARRETO, F. R., SALMON, C. E. G., COVOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Visual stimuli frequency dependence of metabolite changes in the human brain: a pilot study using 31P-MRS In: II Simpósio de Processamento de Sinais da UNICAMP, 2011, Campinas. Caderno de Resumos do II Simpósio de Processamento de Sinais da UNICAMP., 2011.

• Trabalhos em preparação e a serem publicados

- 22. Capítulo de livro: LANDIM, R.C.G., COVOLAN, R.J.M., CASTELLANO, G. O papel do NAA e NAAG na ativação neuronal: modelos bioquímicos e evidências experimentais. In: Neurociências e Epilepsia, Volume 3 (a ser publicado).
- 23. Artigo: LANDIM, R. C. G., EDDEN, R. A. E., FOERSTER, B., LI, L. M., CO-VOLAN, R. J. M., CASTELLANO, G. Investigation of NAA and NAAG dynamics underlying visual stimulation using MEGA-PRESS in a functional MRS experiment (em preparação).

Bibliografia

- R.A. de Graaf. In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques. John Wiley & Sons, 1998.
- [2] J.R. Moffett, B. Ross, P. Arun, C.N. Madhavarao, and A. Namboodiri. N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in Neurobiology*, 81(2):89–131, 2007.
- [3] S.P. Miller, L.M. Li, F. Cendes, E. Tasch, F. Andermann, F. Dubeau, and D.L. Arnold. Medial temporal lobe neuronal damage in temporal and extratemporal lesional epilepsy. *Neurology*, 54(7):1465–1470, 2000.
- [4] R. Jones and A. Waldman. 1 H-MRS evaluation of metabolism in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurological Research*, 26(5):488–495, 2004.
- [5] W. Serles, L.M. Li, S.B. Antel, F. Cendes, J. Gotman, A. Olivier, F. Andermann, F. Dubeau, and D.L. Arnold. Time course of postoperative recovery of N-acetylaspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 42(2):190–197, 2008.
- [6] P.J.W. Pouwels and J. Frahm. Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. NMR in Biomedicine, 10(2):73–78, 1997.
- [7] M.H. Baslow, V.V. Dyakin, K.L. Nowak, B.L. Hungund, and D.N. Guilfoyle. 2-PMPA, a NAAG peptidase inhibitor, attenuates magnetic resonance bold signals in brain of anesthetized mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 26(1):1–16, 2005.
- [8] S.W. Provencher. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. Magnetic Resonance in Medicine, 30(6):672–679, 1993.

- [9] M. Hájek, M. Burian, and M. Dezortová. Application of LCModel for quality control and quantitative in vivo 1-H MR spectroscopy by short echo time STEAM sequence. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 10(1):6–17, 2000.
- [10] H. Vrenken, F. Barkhof, J.A. Castelijns, C.H. Polman, and P.J.W. Pouwels. MR spectroscopic evidence for glial increase but not for neuro-axonal damage in MS normal-appearing white matter. *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(2):256–266, 2005.
- [11] G. Castellano, C.S.B. Dias, B. Foerster, L.M. Li, and R.J.M. Covolan. NAA and NAAG variation in neuronal activation during visual stimulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (45):1031–1036, 2012.
- [12] M.H. Baslow, J. Hrabe, and D.N. Guilfoyle. Dynamic relationship between neurostimulation and N-acetylaspartate metabolism in the human visual cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32(3):235–245, 2007.
- [13] P. Sarchielli, R. Tarducci, O. Presciutti, G. Gobbi, GP Pelliccioli, G. Stipa, A. Alberti, and G. Capocchi. Functional 1H-MRS findings in migraine patients with and without aura assessed interictally. *Neuroimage*, 24(4):1025–1031, 2005.
- [14] S. Mangia, I. Tkáč, R. Gruetter, P.F. Van de Moortele, B. Maraviglia, and K. Ugurbil. Sustained neuronal activation raises oxidative metabolism to a new steady-state level: evidence from 1H NMR spectroscopy in the human visual cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(5):1055–1063, 2006.
- [15] R.A.E. Edden, M.G. Pomper, and P.B. Barker. In vivo differentiation of N-acetylaspartyl glutamate from N-acetyl aspartate at 3 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*, 57(6):977–982, 2007.
- [16] L.G. Hanson. Is Quantum Mechanics necessary for understanding Magnetic Resonance? Concepts in Magnetic Resonance Part A, 32(5):329–340, 2008.
- [17] M.H. Levitt. Spin dynamics. John Wiley & Sons : Chichester, UK, 2001.
- [18] E.M. Haacke, R.W. Brown, M.R. Thompson, and R. Venkatesan. Magnetic Resonance Imaging: physical principles and sequence design. John Wiley & Sons, 1999.

- [19] R.P. Feynman, R.B. Leighton, and M. Sands. Lições de Física de Feynman, volume 2. Bookman, 2008.
- [20] F. Bloch. Nuclear induction. *Physical Review*, 70(7-8):460–474, 1946.
- [21] D.J. Drost, W.R. Riddle, and G.D. Clarke. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: report of AAPM MR Task Group# 9. *Medical Physics*, 29:2177, 2002.
- [22] V. Govindaraju, K. Young, and A.A. Maudsley. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. NMR in Biomedicine, 13(3):129–153, 2000.
- [23] C.P. Slichter. *Principles of magnetic resonance*. Springer, 1996.
- [24] A. Carrington and A.D. McLachlan. Introduction to magnetic resonance: with applications to chemistry and chemical physics. Harper & Row New York, 1967.
- [25] T. Soderberg. Organic Chemistry with a Biological Emphasis, volume 1. Chemistry Faculty, 2010.
- [26] M.A. Brown and R.C. Semelka. MRI: basic principles and applications. Wiley-Blackwell, 2010.
- [27] M. Mescher, H. Merkle, J. Kirsch, M. Garwood, and R. Gruetter. Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression. NMR in Biomedicine, 11(6):266–272, 1998.
- [28] M.H. Baslow and D.N. Guilfoyle. Using proton magnetic resonance imaging and spectroscopy to understand brain "activation". *Brain and Language*, 102(2):153–164, 2007.
- [29] M.H. Baslow. Functions of N-Acetyl-l-Aspartate and N-Acetyl-l-Aspartylglutamate in the vertebrate brain. *Journal of Neurochemistry*, 75(2):453–459, 2002.
- [30] E.E. Benarroch. N-Acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate. *Neurology*, 70(16):1353–1357, 2008.
- [31] Y. Lin, M.C. Stephenson, L. Xin, A. Napolitano, and P. G. Morris. Investigating the metabolic changes due to visual stimulation using functional proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 32(8):1484–1495, 2012.

- [32] S. Mangia and I. Tkac. Letter to the Editor. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35(2):245, 2008.
- [33] M.H. Baslow, J. Hrabe, and D.N. Guilfoyle. Response of the authors to the Letter by Silvia Mangia and Ivan Tkac. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35(2):247–248, 2008.
- [34] G.K. Bhattacharyya and R.A. Johnson. Statistical Concepts and Methods. John Wiley & Sons, 1977.
- [35] N.M. Razali and Y.B. Wah. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1):21–33, 2011.
- [36] A. Naressi, C. Couturier, I. Castang, R. De Beer, and D. Graveron-Demilly. Javabased graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical Magnetic Resonance Spectroscopy signals. *Computers in Biology and Medicine*, 31(4):269–286, 2001.
- [37] X.H. Zhu and W. Chen. Observed BOLD effects on cerebral metabolite resonances in human visual cortex during visual stimulation: a functional 1H MRS study at 4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 46(5):841–847, 2001.
- [38] M.H. Baslow. Evidence that the tri-cellular metabolism of N-acetylaspartate functions as the brain's "operating system": how NAA metabolism supports meaningful intercellular frequency-encoded communications. Amino Acids, 39(5):1139–1145, 2010.
- [39] J. Battistuta, C. Bjartmar, and B.D. Trapp. Postmortem degradation of N-acetyl aspartate and N-acetyl aspartylglutamate: an HPLC analysis of different rat CNS regions. *Neurochemical Research*, 26(6):695–702, 2001.