



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Física “Gleb Wataghin”
Departamento de Raios C3smicos e Cronologia

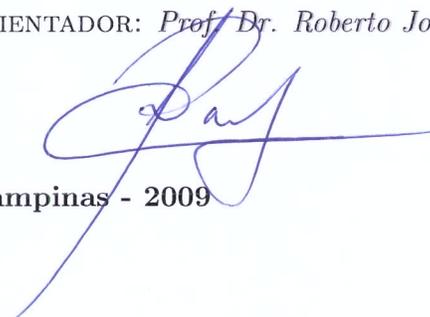
Desenvolvimento de m3todos 3pticos para o estudo do acoplamento neuro-vascular-metab3lico intr3nseco à din4mica cerebral

Rickson Coelho Mesquita

*Este exemplar corresponde
à reda33o final da tese
de doutorado defendida
pelo aluno Rickson Coelho
Mesquita e aprovada pela
comiss3o julgadora.*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Roberto Jos3 Maria Covolan*

Campinas - 2009



16/02/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP

M562d

Mesquita, Rickson Coelho

Desenvolvimento de métodos ópticos para o estudo do acoplamento neuro-vascular-metabólico intrínseco à dinâmica cerebral / Rickson Coelho Mesquita. -- Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador: Roberto José Maria Covolan.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Espectroscopia no infravermelho proximo.
2. Acoplamento neurovascular. 3. Tomografia optica de difusão. 4. Neuroimagem funcional. I. Covolan, Roberto José Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

(smcc/ifgw)

- **Título em inglês:** Development of optical methods to the study of neuro-metabolic-vascular coupling underlying cerebral dynamics
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Near-infrared Spectroscopy
 2. Neurovascular coupling
 3. Diffuse optical imaging
 4. Functional neuroimaging
- **Área de concentração:** Métodos Óticos de Análise
- **Titulação:** Doutor em ciências
- **Banca examinadora:**

Prof. Roberto José Maria Covolan
Prof. Carlos Ernesto Garrido Salmon
Prof^a. Gabriela Castellano
Prof^a. Lorena Pozzo
Prof^a. Maria Concepción Garcia Otaduy
- **Data da defesa:** 09.02.2009
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física



Secretaria de Pós-Graduação - Tel: (19) 3521-5305 FAX: (19) 3521-4142

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **RICKSON COELHO MESQUITA - RA 992239**, APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN" DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 09/02/2009.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan – DRCC/IFGW/UNICAMP
(Orientador do Candidato)

Prof. Dr. Carlos Ernesto Garrido Salmon – USP

Profa. Dra. Gabriela Castellano – DRCC/IFGW/UNICAMP

Profa. Dra. Lorena Pozzo - DFA/IFGW/UNICAMP

Profa. Dra. Maria Concepción García Otaduy - USP

*“You can’t connect the dots looking forward;
You can only connect them looking backwards.
So you have to trust that the dots will somehow connect in your future.
You have to trust in something - your gut, destiny, life, karma, whatever.
Because believing that the dots will connect down the road
will give you the confidence to follow your heart,
even when it leads you off the well worn path.
And that will make all the difference.”^a*

Steve Jobs

^aVocê não pode ligar os pontos olhando pra frente; você só pode conectá-los olhando para o passado. Então, você tem que confiar que os pontos vão se ligar no seu futuro de alguma forma. Você tem que confiar em algo - seu instinto, destino, vida, carma, o que quer que seja. Porque acreditar que os pontos vão se ligar lá na frente vai lhe dar a confiança para seguir seu coração, mesmo quando ele lhe guiar para fora do caminho seguro e confortável. E isto fará toda a diferença.

Aos meus pais e avós,
que com muito carinho me ajudaram
a ser a pessoa que sou hoje.

Agradecimentos

Pouco depois do início de meu doutorado ouvi uma frase que, a primeira vista, parece ser simples: “Knowledge is in the end based on acknowledgment”. Talvez, naquela época, tenha faltado um pouco de maturidade profissional para digerir sua seriedade. Hoje, quatro anos mais tarde, entendo melhor seu real significado. Afinal, um trabalho de doutorado como este não pode ser feito sozinho, e muitas pessoas (muitas mesmo!) foram importantes para que o que fiz nos últimos anos chegasse ao que se segue nas próximas páginas:

À minha família, como sempre meu porto seguro, capaz de me fazer navegar por mares nunca d’antes navegados. Aos meus pais (que são mais do que meus pais biológicos), um dos motivos que me faz ir além a cada dia, agradeço e ofereço tudo o que tenho até hoje. Aos meus avós, presentes e que já se foram, dedico todo este trabalho, fruto do meu esforço, que é pouco comparado ao que vocês fizeram para ajudar a me criar.

Aos meus amigos. Amigos que se foram, amigos que vieram, amigos para sempre. Foram muitas as amizades que fiz nestes últimos anos, e que de certa forma me ajudaram a enxergar obstáculos, e ultrapassá-los. Em especial ao Hugo, Marcio, Alisson e Sergio, que em muitas ocasiões contornaram os caminhos difíceis ao meu lado. Aos colegas de APGF, com quem ri e me diverti nos últimos 6 anos. Aos companheiros com quem convivi diariamente: Giscar, Bruno, Antonio, Maya, Paulo, Thalita e Lívia, pelo ambiente sempre agradável e tranquilo em casa. À Fia, Dânia e Wilson, que fizeram eu me sentir em casa num país diferente. Para o Daniel, Zenner, Tati e Márcia, pessoas com quem dividi momentos importantes nos últimos anos, e com quem aprendi coisas que não estão em livros, meu Muito Obrigado.

Ao grupo de Neurofísica do IFGW-UNICAMP: Gabriela, Maurício, Helka, Elvis, Jane,

Andrea e Carlos, pelos momentos descontraídos e pelos constantes cafés nos fins de tardes. Mas principalmente pela ajuda, “profissional e psicológica”, contribuindo para o desenvolvimento deste projeto e tornando a rotina do laboratório mais fácil.

Ao Photon Migration Imaging lab do MGH, onde tive o prazer de trabalhar por pouco mais de um ano: Qianqian, Andrea, Stefan, Gayatri, Juliette, Anand, Mark, Sava, Anna, Lana, Meryem, Christy e tantos outros com quem aprendi a rotina de um laboratório que não pára, obrigado pelo carinho e pela oportunidade de enxergar além. Ao Will, Ted e Mari, pela paciência durante todo o aprendizado, da língua e da técnica. Ao Buzz, Bob e Ron da TechEn, onde sempre minhas opiniões e eu fomos muito bem-vindos. Em especial, a um grande amigo, Harsha. Obrigado pela companhia durante todo o tempo no MGH, e também depois dele. Sem a sua ajuda, todas as quartas-feiras às 6:30 da manhã (independentemente dos -2° C ou -15° C em Boston), parte deste projeto teria sido inviável.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro nos últimos quatro anos. À OSA e OHBM pelo apoio financeiro e oportunidade de participar das principais conferências internacionais em minha área.

Por último, e não menos especial, aos dois grandes personagens que me ajudaram e incentivaram a chegar no final de mais uma etapa em minha carreira: meus dois orientadores, Roberto Covolan e David Boas. Vocês foram importantes não só para o desenvolvimento deste projeto mas também para o crescimento de minha formação como pesquisador independente, e serei eternamente grato pelo carinho, respeito e atenção que tive ao longo destes anos de doutorado.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A atividade neuronal relacionada a um determinado estímulo ou tarefa induz uma cadeia de complexos eventos biológicos no cérebro. O aumento no consumo de energia induz um acréscimo na demanda por glicose e oxigênio no tecido extravascular. Fatores bioquímicos e neuronais induzem variações nos vasos sanguíneos que resultam em alterações de fluxo sanguíneo, volume e oxigenação. Embora extensivamente investigada, esta cascata de eventos ainda é pouco compreendida. Neste projeto, procuramos descrever o acoplamento entre os níveis celular, metabólico e vascular associado à ativação funcional do cérebro. Usando medidas eletrofisiológicas, modelamos os sistemas neurovascular e neuro-metabólico para descrever a hemodinâmica cerebral medida através de técnicas ópticas. Resultados obtidos em ratos durante a estimulação de um fio de bigode mostraram que a determinação de uma função resposta para cada sistema, assumido como linear, descreve bem o comportamento hemodinâmico e possibilita o estudo dos estados vascular e metabólico caracterizados pelos parâmetros medidos. A partir de experimentos multimodais de NIRS e fMRI, desenvolvemos metodologias inovadoras para a determinação de imagens metabólicas, capazes de prever variações do consumo de oxigênio com boa resolução espacial e temporal. Por fim, analisamos a influência de parâmetros fisiológicos no sinal óptico, mostrando a contribuição importante da pressão sanguínea na composição deste. Medidas de correlação temporal foram projetadas para gerar mapas de correlação vascular que podem ser aplicados ao estudo da conectividade vascular cerebral, tanto em indivíduos normais como em pacientes com patologias cerebrais.

Abstract

Task-associated neuronal activity leads to a complex chain of biological events within the brain. The increased energetics gives rise to elevated glucose and oxygen consumption in the tissue. Biochemical and neuronal factors induce changes in blood vessels and variations in blood flow, volume and oxygenation. Although it has been extensively investigated, this cascade of events is still poorly understood and highly debated. In this project, the aim was to describe the coupling among the cellular, metabolic and vascular levels associated to functional brain activation. Using electrophysiological measurements, we modeled the neuro-vascular and neuro-metabolic systems in order to describe cerebral hemodynamics as seen through optical techniques. Results obtained in rats during whisker-barrel stimulation showed that the determination of a response function for each system, assumed as linear, can describe the hemodynamic behavior and allow the study of the vascular and metabolic states characterized by the measurements. From multimodal experiments of NIRS and fMRI, we developed unique methods to the determination of metabolic images, which can predict changes in oxygen consumption with good temporal and spatial resolution. Finally, we analyzed the influence of the physiology in the optical signal, and showed the importance of taking into account blood pressure oscillations into this signal. Measurements of temporal correlation were projected to generate vascular correlation maps that may be useful to the study of cerebral vascular connectivity, both in normal subjects and in patients with cerebral pathologies.

Sumário

Resumo	ix
Abstract	xi
Nomenclatura	xxi
Apresentação	1
1 Aspectos fundamentais de Neurociência	5
1.1 Aspectos Anatômicos	6
1.2 Aspectos Fisiológicos	9
1.2.1 Fisiologia do estado basal	9
1.2.2 Fisiologia do potencial evocado	15
2 Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Tomografia Óptica de Di-	
 fusão	21
2.1 Métodos ópticos para o estudo funcional do cérebro	22
2.2 Propagação da luz no tecido	25
2.3 Determinação da concentração de cromóforos	28
2.4 Reconstrução da imagem	32
2.5 Instrumentação	33
2.5.1 Métodos de excitação	33

2.5.2	Disposição de fontes e detectores	36
2.5.3	Construção e caracterização do CW6	37
3	Experimentos ópticos de ativação funcional em humanos	41
3.1	Obtenção da resposta hemodinâmica	42
3.2	Dinâmica vascular no córtex motor	44
3.3	Parametrização funcional do córtex sensorial	48
4	Modelagem do acoplamento neuro-vascular-metabólico durante ativação funcional	53
4.1	Modelos utilizados para simular ativação funcional	55
4.1.1	Modelos vasculares	55
4.1.2	Modelos metabólicos	58
4.1.3	Conexões com atividade neuronal	60
4.2	Abordagem via função resposta	61
4.2.1	Construção do modelo direto	62
4.2.2	O modelo inverso	63
4.2.3	Validação do modelo através da variação da amplitude	64
4.3	Descrição bioquímica	73
5	Determinação do consumo de oxigênio durante ativação cerebral	79
5.1	Obtenção do consumo de oxigênio a partir de fMRI	81
5.1.1	O sinal de RM e o efeito BOLD	81
5.1.2	O processo de calibração	83
5.2	O uso de NIRS para a calibração de fMRI	85
5.3	Aplicação do método no córtex sensorial de humanos	87
5.3.1	Protocolo Experimental	87
5.3.2	Resultados e discussão	89

6	Utilização de NIRS para o estudo de flutuações fisiológicas	97
6.1	Influência da fisiologia cerebral para o sinal óptico	98
6.2	Conectividade no estado basal	100
7	Conclusões e Perspectivas	105
A	Propagação da luz em meios difusivos	111
A.1	A equação de transporte radiativa	112
A.2	Solução da equação: a aproximação P_N	115
A.3	A aproximação P_1 : equação de difusão de fótons	118
B	Algoritmos Computacionais	123
B.1	O problema de otimização não-linear	123
B.2	Simulações de Monte Carlo com Cadeias de Markov	124

Lista de Figuras

1.1	Desenho esquemático das estruturas que compõem o cérebro	7
1.2	Divisão do córtex cerebral	8
1.3	Planos de referência dos cortes cerebrais	8
1.4	Figura esquemática de um neurônio e da membrana neuronal	10
1.5	Organização celular no córtex cerebral	11
1.6	Sistema vascular cerebral	13
1.7	Potencial de ação gerado por um neurônio	17
1.8	Variações fisiológicas provocadas por um estímulo	20
2.1	Principais interações do fóton com o tecido	26
2.2	Representação esquemática da técnica NIRS	29
2.3	Espectros de absorção e espalhamento dos principais cromóforos	30
2.4	Métodos de excitação do tecido	34
2.5	Caracterização do CW6	38
2.6	Experimento controlado para verificar sensibilidade do CW6	39
2.7	Varição de OD no experimento controlado	40
3.1	Intensidade da luz que chega num detector	43
3.2	Reconstrução da imagem óptica numa tarefa motora	46
3.3	Resposta hemodinâmica devido a uma tarefa motora	47
3.4	Gerador de pulsos para estimulação do nervo mediano	50

3.5	Geometria usada no experimento de estimulação do nervo mediano	50
3.6	Resposta hemodinâmica obtida para estimulação do nervo mediano	51
4.1	Representação pictórica do modelo de Windkessel	57
4.2	Representação esquemática da abordagem via função resposta	65
4.3	Gráficos de LFP e MUA obtidos durante estimulação do fio de bigode	66
4.4	Respostas hemodinâmicas para deflexão do fio de bigode	68
4.5	Função de transferência estimada no modelo	72
4.6	Comparação dos resultados obtidos via função resposta e por descrição bioquímica	76
4.7	Resultados paramétricos estimados pelos dois modelos propostos	77
5.1	Processo de estimação do consumo de oxigênio	86
5.2	Sincronização temporal e espacial entre NIRS e fMRI	90
5.3	Ativação medida através de NIRS e fMRI para um indivíduo	91
5.4	Ativação média encontrada através de NIRS e fMRI	92
5.5	Estimativas encontradas para a abordagem multimodal proposta	93
5.6	Mapas metabólicos de consumo de oxigênio durante estimulação do nervo mediano	93
5.7	Projeção da região ativada sobre a segmentação do cérebro de um indivíduo	95
6.1	Função resposta entre a pressão sanguínea e o sinal óptico	100
6.2	Geometria usada para cobrir todo o escalpo	101
6.3	Imagens de correlação com o sinal óptico medido (OD)	102
6.4	Imagens de correlação com a reconstrução do sinal óptico e com os resíduos	103
A.1	Representação do transporte de radiação	112
A.2	Representação de um feixe passando através de um material	114

Lista de Tabelas

1.1	Concentração dos íons dentro e fora da membrana neuronal	16
4.1	Parâmetros utilizados no modelo via função resposta	69
4.2	Valores de R^2 e F para diferentes combinações no modelo via função resposta	71
5.1	Coefficientes ópticos utilizados na simulação de Monte Carlo	94

Nomenclatura

ASL - Arterial Spin-Labeling, ou Marcação de Spin Arterial

ATP - Adenosina Trifosfato

BOLD - Blood Oxygenation Level Dependent

CBF - Cerebral Blood Flow, ou Fluxo Sangüíneo Cerebral

CBV - Cerebral Blood Volume, ou Volume Sangüíneo Cerebral

CMRGlc - Cerebral Metabolic Rate of Glucose, ou Consumo Metabólico de Glicose

$CMRO_2$ - Cerebral Metabolic Rate of Oxygen, ou Consumo Metabólico de Oxigênio

CVP - Central Venous Pressão, ou pressão venosa

CW_x - Continuous Wave x, equipamento óptico de modo contínuo, versão x (x=4,5,6)

DOI - Diffuse Optical Imaging, ou obtenção de Imagens por Tomografia Óptica

DOT - Diffuse Optical Tomography, ou Tomografia Óptica de Difusão

EEG - Encefalograma

fMRI - functional Magnetic Resonance Imaging, ou Ressonância Magnética funcional

HbO - Oxi-hemoglobina

HbR - Deoxi-hemoglobina

HbT - Hemoglobina Total ($HbT = HbO + HbR$)

HRF - Hemodynamic Response Function, ou resposta hemodinâmica

ICP - Intracranial Pressure, ou pressão intracranial

ISI - Inter-Stimulus Intervalo, ou intervalo entre-estímulos

LFP - Local Field Potential, ou Potencial de Campo Local

LTI - Linear and Time Invariant, para sistemas lineares e invariantes no tempo
MABP - Mean Arterial Blood Pressure, ou pressão sanguínea arterial média
MEG - Magnetoencefalograma
MRS - Magnetic Resonance Spectroscopy, ou Espectroscopia por Ressonância Magnética
MUA - Multi Unit Activity, ou Atividade multi-unitária
NIR - Near Infrared, ou Infravermelho Próximo
NIRS - Near Infrared Spectroscopy, ou Espectroscopia no Infravermelho Próximo
NO - Nitric Oxide, ou óxido nítrico
OD - Optical Density, ou Densidade Óptica
OEF - Oxygen Extraction Fraction, ou fração de extração de oxigênio
PET - Positron Emission Tomography, ou Tomografia por Emissão de Pósitrons
PS - Pressão Sangüínea
q - Deoxi-hemoglobina
RF - Radiofrequência
RM - Ressonância Magnética
ROI - Region Of Interest, ou Região de Interesse
RTE - Equação de Transporte Radiativa
SI - Região somatossensorial primária
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SNR - Signal to Noise Ratio, ou Relação sinal-ruído
WKM - Windkessel Model, ou modelo de Windkessel

Apresentação

A capacidade para medir a ativação funcional do cérebro humano tem crescido rapidamente nos últimos anos, principalmente devido ao desenvolvimento de técnicas não-invasivas de neuroimagem. Explorando as respostas cerebrais nos níveis celular, metabólico e vascular, vários estudos vêm tentando entender como o cérebro processa estímulos.

Todo este cenário, no entanto, ainda é muito obscuro. Técnicas como eletroencefalograma (EEG) e magnetoencefalograma (MEG) medem respostas relacionadas com campos elétricos e magnéticos produzidos diretamente pela atividade dos neurônios. Embora estas sejam fontes de sinais primárias, com alta resolução temporal - da ordem de milissegundos -, as técnicas em questão possuem resolução espacial muito pobre, transformando a localização da atividade numa tarefa difícil e imprecisa. A utilização de microeletrodos intracranianos, que poderia ser apontada como uma solução para este problema, é altamente invasiva.

Por outro lado, tomografia por emissão de pósitrons (PET), metodologias que utilizam ressonância magnética - como a ressonância magnética funcional (fMRI) e a espectroscopia por ressonância magnética (MRS) - e metodologias que utilizam óptica - como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) e a obtenção de imagens ópticas de difusão (DOI) - são técnicas que podem medir as respostas metabólicas e hemodinâmicas associadas à ativação neuronal. Tratam-se de técnicas com características diversas quanto a resolução espacial e temporal, e que necessitam de um melhor entendimento das relações metabólicas e vasculares com a atividade neuronal, a fim de fornecer uma idéia detalhada

do que acontece no cérebro no momento da ativação.

Durante períodos de atividade cerebral associada à realização de tarefas, o aumento da demanda por energia celular que acompanha a eletrofisiologia neuronal deve ser balanceado por um aumento na quantidade de metabólitos e oxigênio fornecidos para as regiões ativadas do cérebro. O funcionamento cerebral depende da manutenção deste balanço, caracterizado por um acoplamento neuro-vascular (através de vasodilatação e controle de fluxo sanguíneo) e por um acoplamento neuro-metabólico (associado à demanda por energia e o consumo de oxigênio/glicose/lactato).

Neste trabalho, procuramos entender, analisar e descrever detalhes acerca do acoplamento neuro-vascular-metabólico associado à ativação funcional do cérebro. Utilizando métodos ópticos como ferramenta central, construímos modelos e desenvolvemos metodologias originais que permitem descrever as relações entre os sistemas neuronal, vascular e/ou metabólico, explorando relações biofísicas com um enfoque matemático, físico e até mesmo bioquímico.

A redação desta tese segue uma estrutura que se inicia por dois capítulos introdutórios, que são seguidos por quatro capítulos, cada um dos quais apresenta um trabalho diferente, sendo finalizada por um capítulo de conclusões e perspectivas. O Capítulo 1 traz uma breve introdução às principais características do cérebro e de seu funcionamento, fundamentais para o entendimento dos capítulos seguintes. Discutimos os aspectos fisiológicos durante o estado basal, bem como as variações induzidas por um estímulo/tarefa. O Capítulo 2 apresenta os conceitos envolvidos para a aplicação de métodos ópticos ao estudo do cérebro, com foco às técnicas NIRS-DOT, principais ferramentas utilizadas neste trabalho. Além das características intrínsecas às técnicas, discutimos os principais métodos de análise de dados e reconstrução de imagens. No fim, apresentamos detalhes do desenvolvimento e caracterização do CW6, um equipamento de operação em modo contínuo que permite a aquisição de NIRS-DOT com demultiplexação em tempo real, e que foi desenvolvido durante o meu estágio de doutorado sanduíche no Massachusetts

General Hospital (MGH), junto à TechEn, Inc. (Milford, MA, EUA). Dois exemplos funcionais adquiridos com NIRS-DOT podem ser encontrados no Capítulo 3. No primeiro, utilizamos o recém-desenvolvido CW6 durante uma tarefa motora; no segundo, adquirimos respostas hemodinâmicas relacionadas com a estimulação do nervo mediano para diferentes durações. Em ambos, procuramos entender características temporais das curvas de oxigenação, a partir do período de realização da tarefa/estímulo.

Acreditamos que desenvolvimentos via interpretação de modelos e análise do sinal hemodinâmico são úteis aos métodos de neuroimagem, e contribuem para um melhor entendimento das relações neuronais, metabólicas e vasculares. No Capítulo 4 apresentamos nossas principais contribuições nesta direção, que são extensões importantes de modelos previamente publicados para a inclusão de informações neuronais como parâmetros que influenciam diretamente variações vasculares e metabólicas. Validamos os modelos propostos com dados previamente publicados, que determinaram as variações eletrofisiológicas e vasculares durante a estimulação cerebral em ratos.

Este trabalho também teve o propósito de desenvolver e validar novas metodologias experimentais para estimar variações funcionais no metabolismo de oxigênio cerebral através de uma abordagem multimodal. Utilizando técnicas de fMRI e NIRS combinadas, desenvolvemos uma nova abordagem para o processo de calibração de fMRI através de NIRS, de forma a obter uma estimativa mais confiável do consumo de oxigênio. A validação do método proposto foi feita com experimentos de estimulação do nervo mediano em humanos. O Capítulo 5 mostra os resultados obtidos.

No Capítulo 6 analisamos os aspectos temporais do sinal óptico medido através de NIRS-DOT. Assumindo a hipótese de que estes sinais podem revelar informações adicionais relacionadas com a mecânica vascular e a fisiologia do estado basal, estudamos a influência da pressão sangüínea no sinal óptico medido e descrevemos uma função resposta relacionando este parâmetro fisiológico com o referido sinal vascular. Analisando a correlação temporal entre os diferentes canais ópticos, obtivemos pela primeira vez ima-

gens de correlação vascular entre as diferentes regiões cerebrais com métodos ópticos, fornecendo uma nova metodologia para o estudo da conectividade espaço-temporal durante o estado basal. Por fim, o Capítulo 7 resume os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho, apresenta nossas principais conclusões e expõe perspectivas para uma futura continuação do presente projeto.

Capítulo 1

Aspectos fundamentais de Neurociência

O corpo humano é uma máquina biológica complexa que, para melhor compreensão do seu funcionamento, pode ser dividida em diversos sistemas ou aparelhos: digestório, respiratório, circulatório, reprodutor, excretor, nervoso, ósseo e hematopoiético.

Em particular, o sistema nervoso é o conjunto de órgãos responsável por perceber e identificar as condições externas e internas ao próprio organismo, e elaborar respostas que se adaptem a essas condições. De forma bem genérica, pode ser dividido entre o sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Este último é formado por fibras nervosas ou nervos capazes de se infiltrar por todas as partes do corpo e “conduzir” informações entre os órgãos receptores de estímulos e o SNC. Já o SNC é formado pelo eixo cérebro-espinhal, do qual partem os estímulos e ao qual chegam as sensações.

Neste capítulo procuramos abordar as características principais do SNC e de seu principal componente - o cérebro -, que serão fundamentais para o entendimento dos capítulos subsequentes. Começamos com uma breve descrição anatômica do SNC, e em seguida analisamos a fisiologia cerebral, tanto durante o estado estacionário, ou basal, quanto durante uma ativação cerebral.

1.1 Aspectos Anatômicos

O SNC é formado pelo conjunto de todas as estruturas neurais situadas dentro do crânio e da coluna vertebral. Resumidamente, sua função compreende basicamente processamento e integração de informações. No interior da coluna vertebral encontra-se a medula espinhal, enquanto o encéfalo é o principal componente interno à caixa craniana. Este possui uma forma irregular, cheia de dobraduras e saliências (Kandel *et al.* 2000). O encéfalo é protegido por uma série de membranas (meninges): dura mater, aracnóide e a pia mater (Figura 1.1). Sua cavidade interna acompanha as irregularidades de sua forma, dando origem a diferentes câmaras cheias de líquido conhecidas como ventrículos. O encéfalo é composto por três estruturas distintas: o cérebro, o cerebelo e o tronco encefálico.

O tronco encefálico é uma estrutura em forma de haste, responsável por conectar a medula cerebral às principais estruturas do encéfalo, além de coordenar e transmitir informações que chegam até o mesmo. O cerebelo localiza-se próximo do tronco encefálico, e é a parte do encéfalo responsável pela manutenção do equilíbrio e postura corporal, controle do tônus muscular e dos movimentos voluntários, bem como pela aprendizagem motora. É formado por dois hemisférios, os hemisférios cerebelares, e por uma parte central, chamada de Vermis.

O cérebro é a parte mais desenvolvida e a mais volumosa do encéfalo. Dentro do crânio, está envolto por um fluido chamado líquor ou líquido cefalorraquidiano, que tem a função de protegê-lo contra traumatismos, embora também contribua para sua nutrição e manutenção. Pesando aproximadamente 1,2 kg, é dividido em dois hemisférios cerebrais justapostos e separados por uma profunda depressão, porém unidos pelo corpo caloso, que garante a comunicação entre as partes (Kandel *et al.* 2000). Em cada hemisfério pode-se notar duas regiões distintas: uma camada mais externa conhecida como substância cinzenta; e outra camada, mais interna, de substância branca. À área superficial mais externa formada por substância cinzenta dá-se o nome de córtex cerebral.

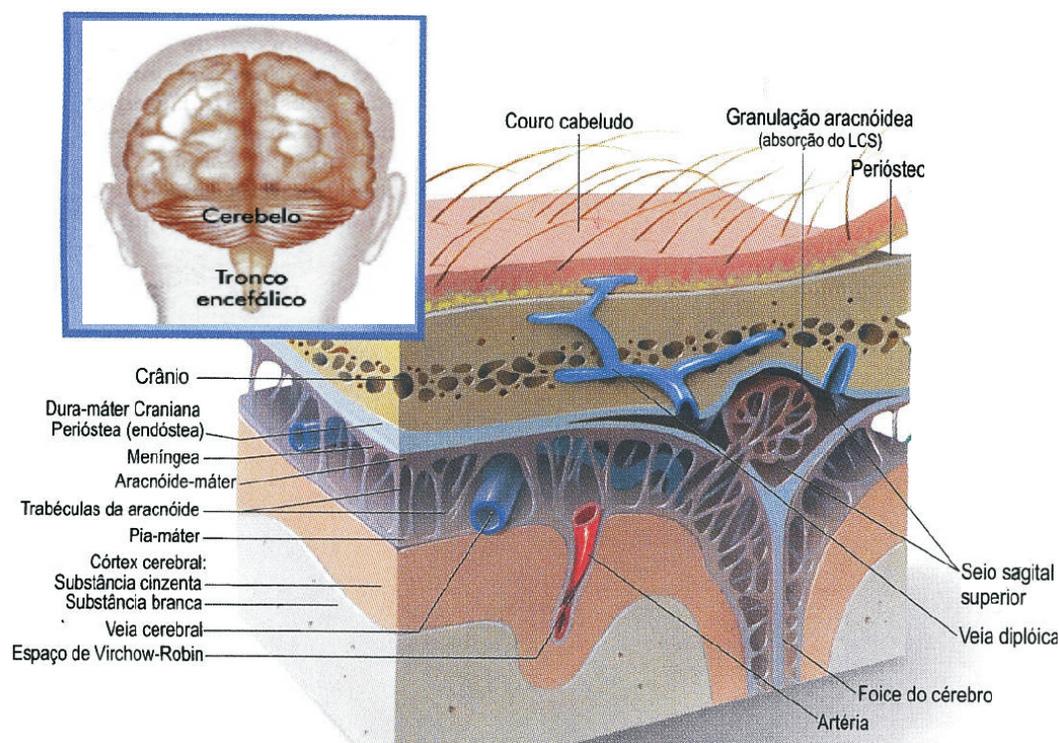


Figura 1.1: *Desenho esquemático de um corte transversal à caixa craniana, mostrando as principais estruturas que protegem e se comunicam com o encéfalo, como as diferentes membranas e vasos sanguíneos (adaptado de Atlas of Anatomy 2007).*

A forma bastante irregular do cérebro, acompanhada pelo córtex, faz surgir grandes dobraduras e estreitas depressões situadas entre as dobraduras, conhecidas como giros e sulcos, respectivamente. A localização de quatro grandes sulcos cerebrais é utilizada para dividir cada hemisfério cerebral em cinco lobos (Figura 1.2(a)): frontal, parietal, occipital, temporal e insular (este último está situado profundamente no interior do hemisfério). Apesar desta divisão ser bastante utilizada, há outras formas de mapear as diferentes regiões cerebrais, de acordo com a conveniência e praticidade de cada estudo. Um exemplo, comumente utilizado em estudos de ativação cerebral e presente neste manuscrito, considera o mapa de Brodmann, que separa o córtex em 47 regiões diferentes (Lent 2004), como mostra a Figura 1.2(b).

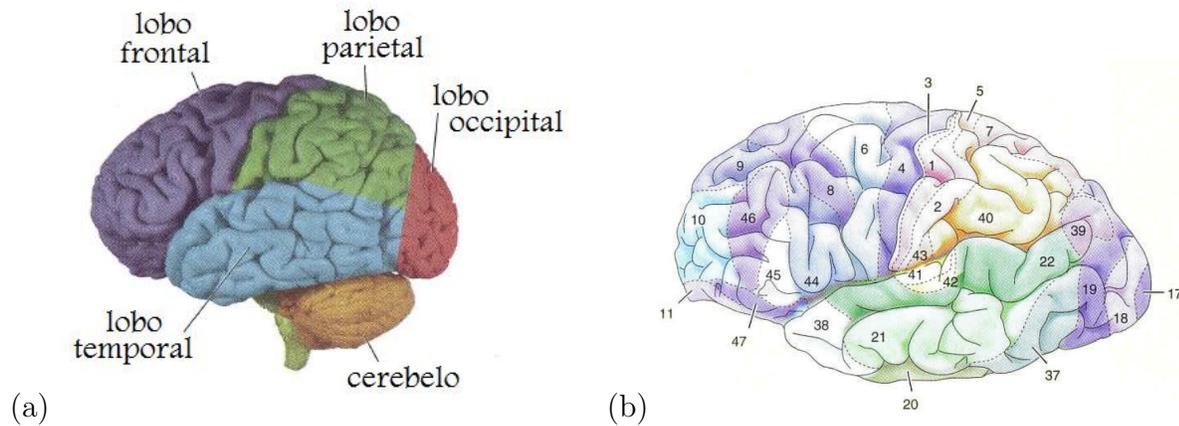


Figura 1.2: (a) Divisão dos lobos no córtex cerebral (adaptado de Nolte 2002). (b) Mapa de Brodmann (retirado de Huettel et al. 2002).

A utilização de planos de referência facilita a compreensão da estrutura tridimensional do SNC. Neste caso, é comum usar três planos com orientações diferentes e perpendiculares entre si: coronal, axial e sagital. A Figura 1.3 mostra esses três planos de corte.

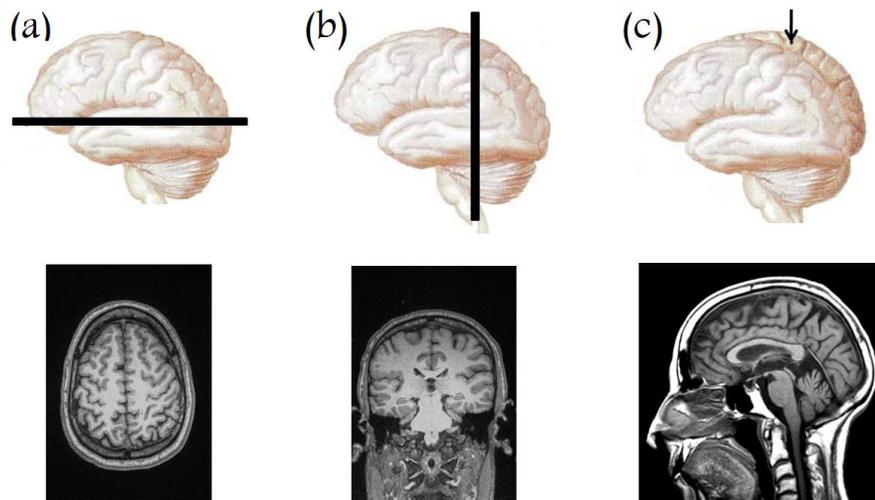


Figura 1.3: Planos de referência (a) axial, (b) coronal e (c) sagital. Na segunda linha, imagens de Ressonância Magnética em cada um dos respectivos cortes.

1.2 Aspectos Fisiológicos

1.2.1 Fisiologia do estado basal

Do ponto de vista microscópico, pode-se identificar duas unidades estruturais e funcionais do sistema nervoso: neurônios e gliócitos (ou células da glia).

O neurônio é a unidade sinalizadora do sistema nervoso, responsável pelo processamento de informações (Figura 1.4). Estima-se que há aproximadamente 10^{11} neurônios no cérebro de um adulto. Há também diferentes tipos de neurônios, como os neurônios piramidais, os de Purkinje, os neurônios bipolares, entre outros (Kandel *et al.* 2000). Como qualquer célula biológica, o neurônio contém organelas que desempenham diferentes funções, tais como: o núcleo, que é responsável por armazenar o material genético da célula; o retículo endoplasmático, onde ocorre a síntese e o armazenamento de substâncias que participam do metabolismo celular; e a mitocôndria, fonte de energia para o funcionamento celular. O que diferencia os neurônios das demais células é a sua morfologia adaptada para o processamento de informações e a variedade de seus tipos morfológicos. Pode-se observar que o corpo neuronal, ou soma, apresenta um grande número de prolongamentos, ramificados múltiplas vezes como pequenos arbustos, conhecidos como dendritos. É através dos dendritos que cada neurônio recebe as informações provenientes dos demais neurônios. A outra projeção filamentar do corpo celular é o axônio, ou fibra nervosa, caracterizado por ser um prolongamento longo e fino, ramificando-se pouco no trajeto e muito na sua porção terminal. Os axônios são revestidos por uma camada isolante, conhecida como bainha de mielina. Cada neurônio tem um único axônio, e é por ele que saem as informações eferentes dirigidas às outras células de uma rede neural.

A membrana neuronal, uma fina camada de lípidios (20 - 70 Å) que separa o meio intracelular do meio externo, contém poros (canais iônicos) que permitem a passagem de certos íons por difusão passiva, de acordo com o gradiente de concentração entre os meios interno e externo. Ao longo da membrana, também há sistemas de transporte responsáveis

por mover íons contra o gradiente de concentração, como a bomba de sódio-potássio, que são peças fundamentais durante a ativação neuronal. Este movimento de íons através de canais e bombas é responsável pela sinalização e excitação do sistema nervoso.

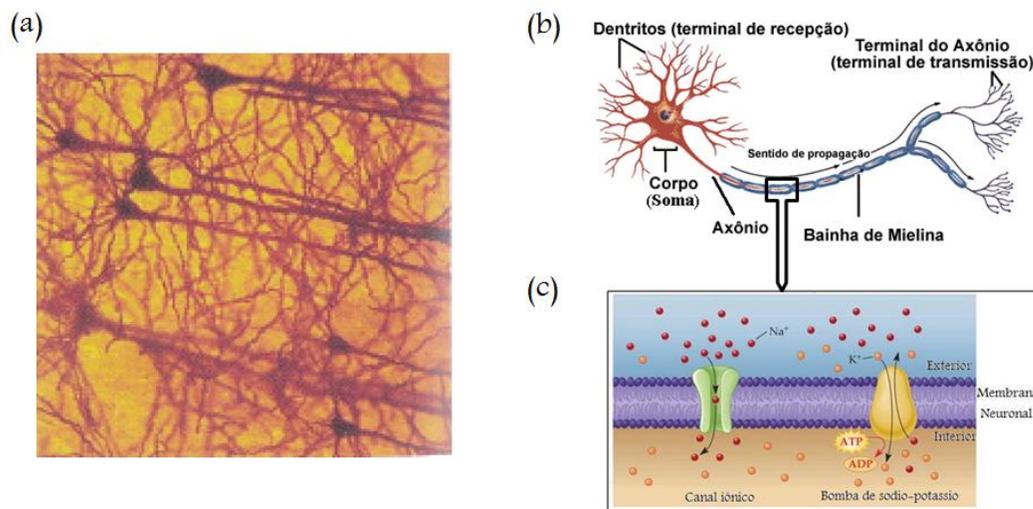


Figura 1.4: (a) *Fotomicroscopia de um conjunto de neurônios piramidais (retirado de Atlas of Anatomy 2007)*; (b) e (c) *mostram figuras esquemáticas de um único neurônio e da sua membrana neuronal, respectivamente (baseado em Huettel et al. 2003)*.

Do ponto de vista macroscópico, os neurônios são agrupados em grandes conjuntos com identidade funcional (redes neurais). Isso faz com que as diferentes funções sejam localizadas em regiões restritas no cérebro. Cada região, no entanto, faz a sua parte, contribuindo para a integração funcional do conjunto. O córtex cerebral, por exemplo, pode ser dividido em 6 diferentes camadas microscópicas (Figura 1.5). As células corticais estão verticalmente conectadas umas com as outras, cada uma com diferentes funcionalidades: os estímulos do mundo externo chegam pela camada IV; as camadas V e VI processam a informação e a enviam para as estruturas subcorticais; as camadas II e III são responsáveis pela conectividade cerebral, se comunicando com as outras regiões corticais.

Outros tipos de células presentes no sistema cerebral, os gliócitos, são muito mais numerosos que os neurônios, e também apresentam diferentes tipos morfológicos, incluindo

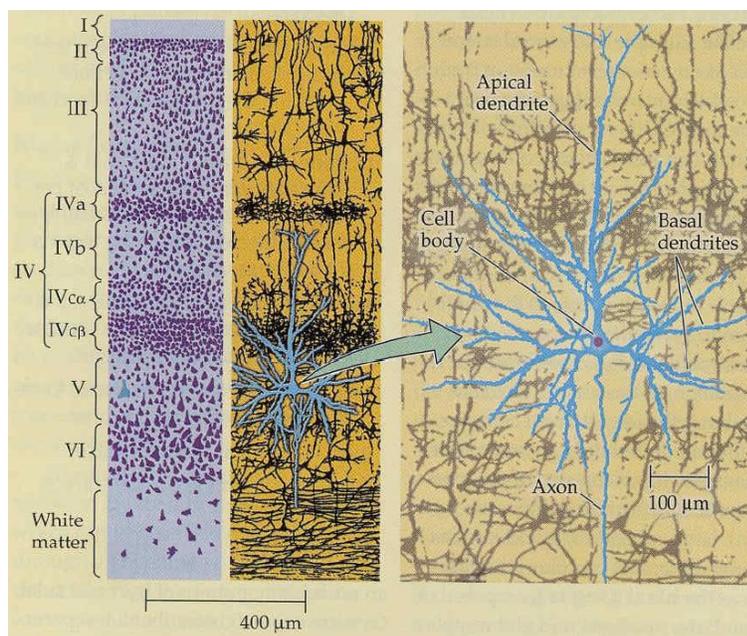


Figura 1.5: *Diagrama esquemático da organização celular no córtex cerebral, mostrando as diversas conexões de uma célula piramidal do córtex (retirado de Huettel et al. 2002).*

os astrócitos, oligodendrócitos, e células microgliais. Do seu corpo celular saem inúmeros prolongamentos que se enovelam e ramificam nas proximidades. Esses prolongamentos podem entrar em contato com capilares sangüíneos e células nervosas, estabelecendo entre eles uma “ponte” metabólica. Este conjunto de células não-neuronais tem como principal atividade desempenhar funções de infra-estrutura: nutrem, dão sustentação mecânica, controlam o metabolismo dos neurônios, ajudam a construir o tecido nervoso durante o desenvolvimento e funcionam como células imunitárias. No entanto, vários estudos têm demonstrado que os astrócitos desenvolvem um papel muito mais fundamental durante a ativação neuronal, principalmente do ponto de vista metabólico (Kasischke *et al.* 2004, Hertz *et al.* 2007).

Com toda essa estrutura microscópica de larga escala, manter a homeostase cerebral torna-se de fundamental importância para a sobrevivência do cérebro. Este processo demanda o consumo de energia, mesmo durante o estado estacionário. A principal fonte

de energia para qualquer célula é a molécula de adenosina trifosfato (ATP), um nucleotídeo que contém três grupos fosfato. É possível produzir ATP a partir de glicose e outros metabólitos. No caso da glicose, esta pode ser convertida em lactato por um processo rápido, que acontece nos astrócitos, produzindo 2 ATP (ciclo anaeróbico). Se houver oxigênio disponível, este processo de quebra em lactato ocorre preferencialmente nos neurônios, e o resultado é uma produção bem maior de energia, liberando um adicional de 34 moléculas de ATP (ciclo aeróbico).

Sob condições normais, a energia fornecida para o cérebro vem quase que exclusivamente do metabolismo de glicose (Dienel 2002). Esta energia fornecida pela oxidação de glicose suporta funções de processamento de informação durante o estado basal, incluindo a manutenção de potenciais de membrana, transporte ao longo do axônio, ativação de canais iônicos, e outras (Shulman *et al.* 2001a). Embora o cérebro ocupe apenas 2% da massa corporal, usa aproximadamente 20% de todo o oxigênio e glicose disponíveis no corpo (Magistretti *et al.* 1999). No entanto, o cérebro mantém um nível baixo de glicose no estado basal ($2\mu\text{moles/g}$ no cérebro de ratos (Dienel 2002, Veech *et al.* 1973)), sendo necessário um contínuo abastecimento de glicose e oxigênio¹. É este um dos propósitos do sistema vascular cerebral.

Para cumprir a função de suprir as necessidades sangüíneas do cérebro, esse sistema é organizado de forma bastante complexa, constituindo-se numa rede vascular altamente ramificada e extensa (Figura 1.6). O sangue, com moléculas de hemoglobina oxigenada (oxi-hemoglobina), penetra no encéfalo através de grandes vasos responsáveis por levar o sangue do coração ao resto do corpo, as artérias. Estas, por sua vez, se dividem em artérias menores, conhecidas como arteríolas, que terminam em capilares. As escalas espaciais desses vasos variam quatro ordens de grandeza, de aproximadamente 1 cm (diâmetro de uma artéria principal) até $10\mu\text{m}$, que é o tamanho aproximado do diâmetro de um capilar.

A rede capilar tem características especiais, diferentes dos demais tecidos, possuindo

¹Em circunstâncias normais, o cérebro extrai aproximadamente 10% de 90 mg/dL de glicose no sangue arterial.

A organização funcional do cérebro é, ao menos em parte, refletida na densidade de vasos sangüíneos. Áreas com alto metabolismo têm uma densidade de capilares maior do que áreas com baixo índice metabólico. Do ponto de vista de consumo, o cérebro humano adulto consome aproximadamente 54 ml de sangue para cada 100 g de tecido por minuto. Isso significa um fluxo de 750 ml de sangue por minuto para todo o cérebro (Buxton 2002).

O fluxo sangüíneo varia consideravelmente ao longo do sistema vascular e é influenciado por vários fatores físicos e fisiológicos, incluindo a pressão sangüínea, o diâmetro do vaso, a densidade de glóbulos vermelhos, a quantidade de oxigênio e dióxido de carbono, e a idade, saúde e nível de atividade de um indivíduo. Entende-se por fluxo sangüíneo cerebral (CBF) a taxa de entrega de sangue arterial à rede capilar de uma massa particular de tecido. Uma unidade comum para expressar o CBF é milímetros de sangue por 100 g de tecido por minuto, e um típico valor de CBF no cérebro humano é $60\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{min}$. Em algumas circunstâncias é mais conveniente expressar o CBF como o fluxo entregue a uma unidade de volume do tecido, ao invés da massa. No entanto, como a densidade do cérebro é próxima de 1 g/ml, valores de CBF também podem ser expressos em ml/ml.min, que é essencialmente uma unidade de $(\text{tempo})^{-1}$.

A velocidade do sangue nos vasos também é um parâmetro fisiológico importante. A velocidade média varia de dezenas de cm/s, nas artérias anterior e posterior, até valores menores do que 1 mm/s, nos capilares. Estudos sobre a passagem de células vermelhas através dos capilares mostram que o fluxo de sangue é geralmente irregular, provavelmente devido ao fato do tamanho destas células ser da mesma ordem de grandeza do diâmetro dos capilares, de forma que as células vermelhas se deformam. Uma forma de aumentar o CBF é aumentar a velocidade sangüínea nos capilares (Buxton 2002).

O volume sangüíneo cerebral (CBV) é a fração do volume de tecido ocupado pelos vasos sangüíneos, e um valor típico para o cérebro é 4%. O CBV é um número adimensional (milímetros de vasos sangüíneos por milímetros de tecido), e geralmente se refere ao volume vascular inteiro dentro do tecido.

Embora CBF, CBV e velocidade sangüínea sejam todos aspectos importantes do estado de perfusão do tecido², são quantidades fisiológicas distintas. A partir das definições acima, pode-se perceber que o CBF não depende explicitamente do volume sangüíneo ou da velocidade nos vasos. Um mesmo aumento no CBF pode ocorrer através de diferentes variações tanto no CBV como na velocidade do sangue, ou em ambos. Por exemplo, um aumento na velocidade sangüínea numa rede capilar fixa ou um aumento no número de capilares, mas com a mesma velocidade em cada capilar pode levar a um mesmo aumento no CBF. Assim, a especificação do volume sangüíneo ou da velocidade não determina o CBF. O que diferencia as duas situações no exemplo anterior é o tempo de trânsito no capilar

$$\tau = \frac{CBV}{CBF} \quad (1.1)$$

que, como o próprio nome diz, representa o tempo de trânsito médio do sangue através do volume definido pelo CBV. Para um fluxo de aproximadamente 60 ml/100 g.min e um valor típico de CBV de 4%, o tempo de trânsito vascular é da ordem de 4 s.

1.2.2 Fisiologia do potencial evocado

Uma atividade neuronal pode ser caracterizada como integradora ou sinalizadora. Uma atividade integradora coleta sinais (entradas) de outros neurônios através das conexões dos dendritos e do soma. A atividade sinalizadora resulta da atividade dos axônios, que transmite o resultado dos processos integradores (saída) para um ou mais neurônios. Do ponto de vista bioquímico, este resultado vem da variação da concentração dos principais íons presentes em torno da membrana, alterando o potencial da membrana do seu potencial de equilíbrio.

Isto é possível graças à variação da permeabilidade da membrana a determinados íons, como K^+ e Na^+ , que permite a passagem de íons para dentro e fora da membrana. Os

²O termo perfusão é usado para descrever o processo de entrega nutricional do sangue arterial para uma rede capilar no tecido.

valores estimados das concentrações dos principais íons que contribuem para a formação do potencial de membrana no equilíbrio são mostrados na Tabela 1.1. Hodgkin e Huxley mostraram que a membrana neuronal responde a um estímulo como um circuito RC, com uma constante de tempo bem determinada e que varia de acordo com o tipo de célula (Hodgkin and Huxley 1952). No entanto, dependendo da “corrente injetada no circuito”, a diferença de potencial na membrana pode ultrapassar um certo limiar a partir do qual o comportamento de cada canal iônico é não-linear. Quando isto acontece, os canais de sódio, e posteriormente de potássio, se abrem, de forma que os íons de Na^+ entram na célula e K^+ saem, tornando o potencial de membrana altamente positivo num processo conhecido como despolarização. Alguns milisegundos depois, os canais de Na^+ se fecham enquanto íons de K^+ continuam deixando a célula, e o potencial de membrana diminui até um valor menor que o de equilíbrio, num processo conhecido como hiperpolarização da membrana. Neste momento, os canais de potássio também se fecham e a difusão passiva, além de outros mecanismos como a bomba de Na-K, reestabelecem o potencial de repouso da membrana³. Toda essa variação brusca no potencial da membrana é conhecida como potencial de ação, e constitui a informação processada, que será passada adiante através do axônio (Figura 1.7).

Tabela 1.1: *Concentração dos principais íons no interior e exterior da membrana neuronal.*

Íon	Interior	Exterior
Na^+	10 mM	142 mM
K^+	148 mM	5 mM
Ca^{+2}	$< 1\mu M$	5 mM
Cl^-	4 mM	103 mM

A transferência desta informação ocorre em junções especializadas dos neurônios, co-

³Apesar de outros íons, como Ca^{2+} e Cl^- , também contribuírem para os processos de despolarização e hiperpolarização da membrana, as principais contribuições vêm de K^+ e Na^+ .

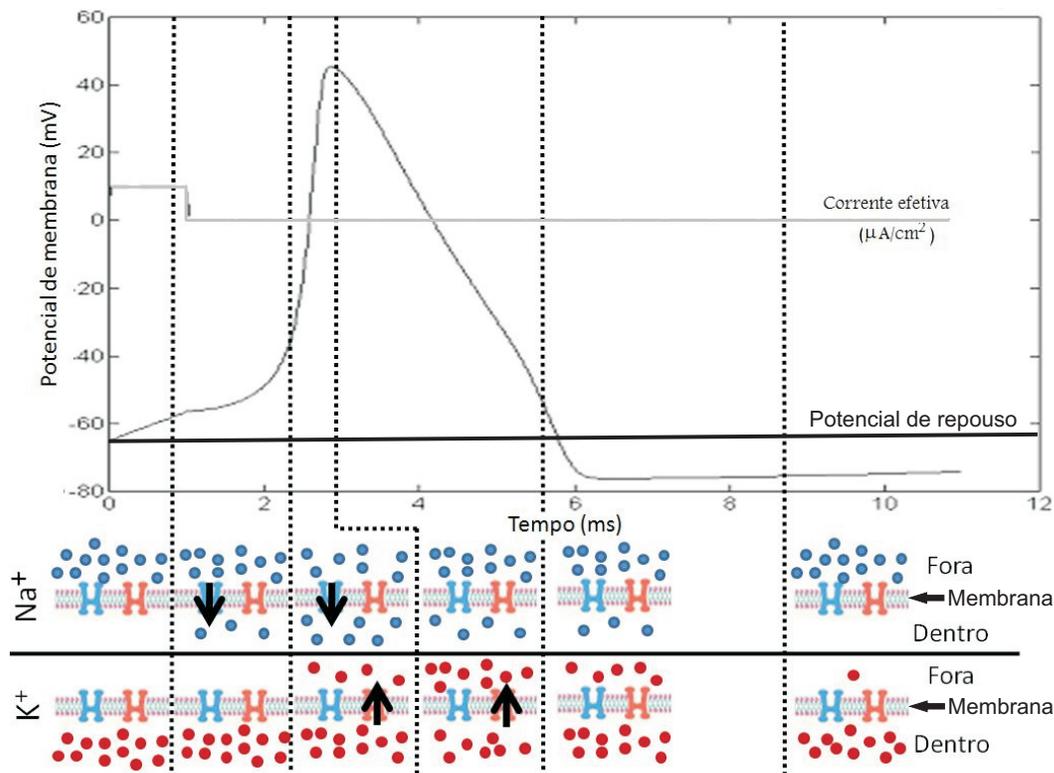


Figura 1.7: *Potencial de ação gerado por um neurônio, com sua devida interpretação bioquímica.*

nhecidas como sinapses, que são conexões entre o axônio de um neurônio e a árvore dendrital de outro. Em cada neurônio, há aproximadamente 10 mil sinapses, das quais 8 mil estão localizadas nos dendritos e 2 mil no corpo celular, o que dá uma idéia de quão complexo é o sistema nervoso. A grosso modo, podemos dizer que as sinapses são regiões especializadas de comunicação entre dois neurônios e compreendidas entre duas membranas celulares: a membrana pré-sináptica, por onde chega o estímulo proveniente de uma outra célula, e a membrana pós-sináptica, que é a do dendrito.

Uma sinapse isolada teria pouca utilidade, porque a capacidade de processamento de informação do sistema nervoso provém da integração entre as milhares de sinapses existentes em cada neurônio. Todas elas interagem: os efeitos excitatórios e inibitórios de cada uma delas sobre o potencial de repouso do neurônio pós-sináptico somam-se algebricamente.

camente, e o resultado dessa interação é que caracterizará a mensagem que emerge através do axônio do segundo neurônio, em direção a outras células. O impulso nervoso ou potencial de ação propaga-se ao longo da membrana quando a despolarização é suficientemente acentuada para cruzar um determinado valor conhecido como limiar de disparo.

Acoplamento neuro-metabólico-vascular

O disparo de um potencial de ação não requer fonte de energia externa, pois os movimentos associados dos íons estão na direção dos gradientes de concentração. No entanto, estes potenciais causam variações na concentração de íons que necessitam de energia externa para voltar ao equilíbrio. Por exemplo, o influxo de Na^+ durante um potencial de ação causa uma variação no potencial de membrana, de forma que gradientes elétricos tendem a se opor à entrada de íons de K^+ na célula. Para reestabelecer a distribuição destes íons na membrana, é necessária a utilização da bomba de sódio-potássio, removendo íons de Na^+ da célula e levando íons de K^+ para dentro desta. Assim, regiões localizadas do cérebro requerem fontes de energia externas para suportar processos metabólicos, e muita desta energia facilita a restauração de gradientes de concentração após variações no potencial de membrana.

O consumo de ATP para reestabelecer o estado estacionário na célula requer o fornecimento de metabólitos (glicose e oxigênio) ao tecido, uma vez que o cérebro não mantém uma reserva destes componentes. Durante o estado basal, este fornecimento, proveniente do sangue arterial, é balanceado pelo metabolismo celular. Durante uma atividade neuronal, no entanto, é necessário um aumento da concentração de glicose e oxigênio a fim de suprir o aumento das variações do potencial elétrico na membrana. Estudos pioneiros realizados com PET mostraram de fato um aumento tanto no consumo metabólico de glicose ($CMRGlc$) (Fox *et al.* 1988) quanto no consumo metabólico de oxigênio ($CMRO_2$) (Ginsberg *et al.* 1988), ambos relacionados com uma ativação cerebral⁴.

⁴Entende-se por ativação cerebral perturbações dos níveis basais de parâmetros eletrofisiológicos,

A necessidade de um maior consumo de metabólitos durante o potencial evocado faz com que os parâmetros vasculares, ou hemodinâmicos, também sofram alterações. Para atender à maior demanda local de componentes metabólicos, tanto o fluxo quanto o volume sanguíneos também aumentam devido à ativação neuronal. Apesar da exata relação entre todas estas variáveis estar longe de ser bem entendida - e um dos objetivos deste trabalho é propor métodos diretos para um melhor conhecimento da correlação entre as grandezas envolvidas - há uma certa concordância entre alguns parâmetros medidos por diferentes técnicas e/ou tipos de estímulo. Por exemplo, nota-se que a razão entre as variações $\Delta CBF:\Delta CMRGlc$ é aproximadamente 1:1 (sendo aproximadamente 50%), enquanto as variações $\Delta CBF:\Delta CMRO_2$ giram em torno de 2 a 6:1 (Fox and Raichle 1986, Fox *et al.* 1988, Shulman *et al.* 2001b). Essa variação não-proporcional entre CBF e $CMRO_2$ também altera a oxigenação dos vasos sanguíneos, pois como o fluxo passa a ser maior do que o consumo metabólico, há uma diminuição na fração de extração de oxigênio pelo tecido (OEF), provocando um aumento de concentração de oxi-hemoglobina (HbO) e, conseqüentemente, uma diminuição relativa de concentração de deoxi-hemoglobina (HbR) na região ativada. Embora não se saiba até hoje porque há essa diferença nas variações de CBF e $CMRO_2$, este resultado indica que o ciclo anaeróbico pode desempenhar uma via metabólica importante durante o potencial evocado.

De qualquer modo, nota-se que há um acoplamento neuro-vascular-metabólico cerebral, isto é, uma variação nos parâmetros vasculares e/ou metabólicos devido às variações nos parâmetros celulares. Embora os estudos de Roy e Sherrington são os mais citados na literatura como os primeiros a discutir a relação entre CBF e atividade neuronal (Roy and Sherrington 1890), trabalhos anteriores de Mosso já haviam descrito um aumento no CBF relacionado com o comportamento, independente da pressão sanguínea (Toga and Mazziotta 2000). Acredita-se que este aumento de fluxo sanguíneo é iniciado a partir da liberação de certas substâncias pelos neurônios (agentes vasodilatadores), responsáveis metabólicos e/ou vasculares. Isso não significa que os níveis eletrofisiológicos, de fluxo e metabolismo sejam zero no estado basal, mas sim que estes convergem para valores médios bem definidos

pela dilatação dos vasos sanguíneos. Desta forma, pode-se inferir a existência de uma relação direta entre CBF e CBV. De fato, Grubb mostrou que esta relação pode ser descrita por uma lei de potência empírica (Grubb *et al.* 1974):

$$\frac{CBV}{CBV_0} = \left(\frac{CBF}{CBF_0} \right)^\alpha \quad (1.2)$$

onde CBF_0 e CBV_0 são o fluxo e o volume sanguíneo durante o estado basal, respectivamente, e $\alpha \approx 0,38$. No entanto, esta lei é válida apenas durante o regime estacionário, não sendo obedecida durante o regime transiente.

Em resumo, uma ativação neuronal provocada por um estímulo numa certa posição do cérebro, num tempo t , desencadeia uma série de fenômenos, muitas vezes concomitantes: a concentração de íons e moléculas muda no interior do neurônio, que despolariza e/ou hiperpolariza sua membrana; a restauração do potencial de equilíbrio consome ATP, e com isso o consumo metabólico de glicose e oxigênio aumenta, sendo necessário o fornecimento destes pelo sistema vascular; a produção de agentes dilatadores provoca o aumento de CBF, CBV e da velocidade sanguínea, assim como da oxigenação do tecido. Todo esse complexo mecanismo está representado na Figura 1.8.

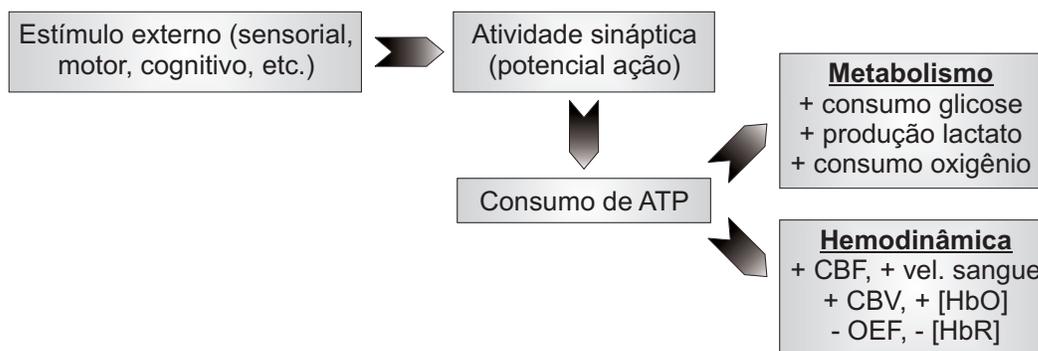


Figura 1.8: *Resumo das variações fisiológicas que acompanham um estímulo funcional. O sinal + (-) indica um aumento (diminuição) do parâmetro indicado.*

Capítulo 2

Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Tomografia Óptica de Difusão

A capacidade de observar a ativação funcional do cérebro tem crescido rapidamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento de várias técnicas não-invasivas, explorando as respostas funcionais nos níveis neuronal, metabólico e vascular, e fornecendo uma idéia detalhada do que acontece no cérebro no momento da ativação.

No entanto, esse cenário ainda é bastante incompleto. Eletroencefalografia (EEG) e magnetoencefalografia (MEG) são técnicas que medem respostas eletrofisiológicas diretamente relacionadas com ativação neuronal com excelente resolução temporal, porém com uma resolução espacial relativamente pobre. Além disso, é difícil localizar a origem do sinal medido. PET, ressonância magnética funcional (fMRI) e técnicas derivadas de RM, como a Espectroscopia por Ressonância Magnética, por outro lado, medem respostas hemodinâmicas e metabólicas, com melhor resolução espacial (particularmente fMRI, que pode chegar a uma resolução melhor que 1 mm^3). Contudo, essa resolução espacial é atingida às custas de uma perda de resolução temporal e de informação neuronal direta.

Em meio a esse cenário, espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) e tomografia óptica de difusão (DOT) são técnicas ópticas emergentes cada vez mais empregadas para o mapeamento funcional do cérebro, seja em humanos ou em animais. Estas técnicas utilizam níveis seguros de intensidade de luz, com comprimentos de onda entre 650 e 950 nm, que penetra até alguns centímetros no tecido biológico, permitindo assim atingir o córtex e interagir com oxi- e deoxi-hemoglobina do sangue cerebral. Medindo-se a intensidade da luz que emerge do crânio através de detectores colocados sobre o escalpo, pode-se inferir, de forma não-invasiva, a variação do nível de oxigenação do tecido cerebral, permitindo a localização de regiões de ativação. Através destas técnicas pode-se buscar um melhor entendimento do acoplamento neuro-vascular, das flutuações neurofisiológicas e da hemodinâmica cerebral. Esta versatilidade também motiva a sua aplicação conjugada a outros métodos de neuroimagem, principalmente com a ressonância magnética funcional (fMRI), através de abordagens multimodais. Neste capítulo, apresentamos os conceitos fundamentais da técnica NIRS-DOT e discutimos seus principais métodos de análise e de reconstrução de imagens. Partes do texto foram publicados no seguinte capítulo de livro:

- Mesquita R.C. e Covolan R.J.M. (2008), *Estudo funcional do cérebro através de NIRS e tomografia óptica de difusão*, In: Neurociências e epilepsia (Série CInAPCe vol 1), Li L.M. (ed), Plêiade, São Paulo.

2.1 Utilização de métodos ópticos para o estudo funcional do cérebro

O uso de imagens ópticas na região do infravermelho próximo como meio de investigação em neurociências tem sido cada vez mais freqüente. Ao longo da última década, este tipo de tecnologia deixou de ser apenas promissora para se tornar uma realidade prática. Atualmente, a obtenção de imagens cerebrais através de técnicas ópticas é prática comum nos principais laboratórios de neuroimagem do mundo.

Para entender o princípio básico desta tecnologia emergente, é necessário conhecer um pouco sobre como a luz interage com o tecido biológico. De forma geral, quando uma onda eletromagnética incide num meio material, vários fenômenos podem acontecer: enquanto parte da luz é refletida, outra parte consegue penetrar no material óptico. Ao se propagar dentro do meio, a onda eletromagnética pode sofrer refração, ser absorvida ou espalhada pelos átomos/moléculas que compõem esse meio, além de poder contribuir para processos de luminescência¹. A probabilidade de ocorrência de cada um desses fenômenos depende das propriedades ópticas do meio, que por sua vez dependem do comprimento de onda da radiação.

Ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda na faixa do infravermelho, de aproximadamente 2500 nm a 25 μm , são facilmente absorvidas pelo tecido humano através de seu principal constituinte, a água, cujo espectro favorece a absorção de luz nessa região. Por outro lado, a luz visível, que ocupa uma faixa de comprimentos de onda entre 400 nm e 700 nm, aproximadamente, é fortemente espalhada pelo tecido humano e não consegue atravessá-lo. Entre o espectro visível e a região do infravermelho temos o infravermelho próximo (NIR), localizado entre 750 nm a 2500 nm, aproximadamente. Nessa região, a luz NIR é fracamente absorvida pelo tecido humano. O seu coeficiente de espalhamento é tal que faz com que a luz incidente se espalhe em todas as direções, tornando possível detectar este tipo de radiação mesmo após ter penetrado alguns centímetros no tecido. É esta “janela óptica” do tecido humano que é explorada através da espectroscopia, denominada NIRS, que pode ser utilizada como uma forma de mapeamento cerebral e cujos fundamentos estão detalhados adiante.

Do ponto de vista de suas propriedades ópticas, o tecido biológico pode ser descrito através dos coeficientes de absorção (μ_a) e de espalhamento (μ_s). Valores típicos para estas grandezas são $\mu_a = 0,1cm^{-1}$ e $\mu_s = 100cm^{-1}$ (Wang and Wu 2007). Nos comprimentos de onda aqui considerados, μ_a varia significativamente com a concentração e o tipo de

¹Se a intensidade do feixe de luz for muito alta, outros fenômenos não lineares também podem ocorrer.

hemoglobina presente no tecido. É esta sensibilidade das propriedades ópticas da HbO e da HbR, aliada ao fato de ser baixo o coeficiente de absorção da água nessa região, que permite determinar os níveis de oxigenação do tecido com base no espalhamento de luz.

Em resumo, a obtenção de imagens ópticas e a espectroscopia óptica consistem em explorar as características ópticas do tecido biológico, que é altamente espalhador de luz e que possui coeficientes de absorção relativamente baixos na região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético. Estas propriedades permitem a penetração da luz no tecido e sua conseqüente propagação por alguns milímetros. A interação dos fótons com moléculas fotossensíveis presentes no meio (conhecidas como cromóforos), como HbO, HbR e água, permite inferir informações sobre o nível de oxigenação do tecido. Com isto, é possível produzir espectros e imagens ópticos para aplicações médicas, de forma segura e não-invasiva, a partir de um tipo de radiação não-ionizante, e de baixa potência.

As primeiras evidências do uso de luz contínua em aplicações médicas datam do início do século passado, quando Cutler propôs detectar lesões com este método, em 1929 (Cutler 1929). Em meados da década de 1930 apareceram os primeiros oxímetros, instrumentos que fornecem informação da saturação de oxigênio no sangue arterial (Peterson 1986), e que utilizam o mesmo princípio das técnicas de NIRS para o estudo do cérebro. Mais tarde, o advento do laser na década de 1960 levou ao aparecimento de técnicas mais robustas, explorando as propriedades desta nova fonte de luz, como estudos para a determinação do fluxo sanguíneo através do Doppler com luz laser (fluxometria por Doppler com laser) (Tanaka *et al.* 1974).

Apesar da oximetria e fluxometria por Doppler com lasers fornecerem informações a partir das propriedades ópticas do tecido, nenhuma delas é capaz de medir a dinâmica vascular do cérebro a partir do escalpo. Foi somente no fim da década de 1970, a partir dos trabalhos pioneiros de Jöbsis (Jöbsis 1977), que surge a espectroscopia no infravermelho próximo (ou NIRS), com o objetivo de monitorar no tempo as variações da oxigenação cerebral durante o estado basal. Utilizando os princípios das técnicas anteri-

ormente citadas e fontes de luz na faixa do infravermelho próximo, capazes de penetrar o escalpo de forma não-invasiva, a NIRS permite quantificar variações relativas na concentração de cromóforos dentro de meios altamente espalhadores de luz (como o cérebro), medindo a densidade de fótons após se propagarem nesse meio. Pouco mais de uma década depois, percebeu-se que é possível ir além da espectroscopia e localizar espacialmente as variações das propriedades de absorção e espalhamento do tecido, produzindo imagens não-invasivas que refletem parâmetros hemodinâmicos, como volume sanguíneo e oxigenação. Deu-se início à obtenção de Imagens Ópticas por Difusão (DOI), ou Tomografia Óptica de Difusão (DOT), cuja idéia básica é iluminar o tecido com um conjunto de fontes de luz e medir a luz espalhada com outro conjunto de detectores². Desde então, tanto NIRS quanto DOI passaram a ser cada vez mais utilizadas como técnicas não-invasivas disponíveis para estudos do cérebro humano. A variedade de possíveis aplicações, aliada ao baixo custo e à sua portabilidade, torna este método ainda mais atraente para estudos em neurociência funcional.

2.2 Propagação da luz no tecido

Em princípio, a propagação da luz no tecido poderia ser modelada como um feixe de luz penetrando num meio óptico, diretamente a partir das equações de Maxwell ou utilizando óptica geométrica. No entanto, em meios densos, o número de interações entre os fótons e o meio é muito grande (Figura 2.1), tornando o estudo através destas abordagens inviável. O livre caminho médio no tecido biológico, por exemplo, é da ordem de $28 \mu\text{m}$, correspondendo a um tempo de propagação de aproximadamente 0,13 ps (Wang and Wu 2007). Nesses casos, uma descrição em termos do movimento aleatório de fótons entre as moléculas do meio (modelo corpuscular) torna-se mais adequada.

Uma possível abordagem que leva em consideração a propagação de fótons num meio

²O termo *difusão* refere-se à forma de transporte de fótons, que pode ser aproximado por um transporte difusivo.

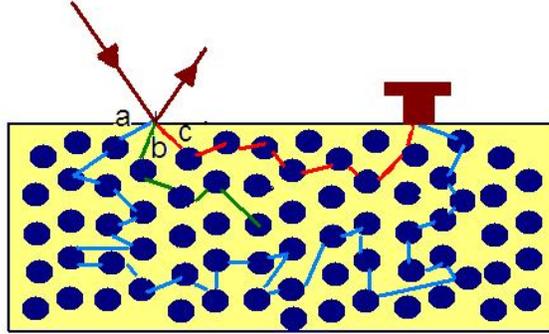


Figura 2.1: Representação pictórica das principais interações que um fóton pode sofrer durante sua propagação no tecido biológico: sucessivos espalhamentos com as moléculas do meio podem resultar em diferentes caminhos, mais curtos (c) ou mais longos (a); menos comum em meios turvos, há ainda alguns fótons que são absorvidos pelo meio (b).

muito denso é a teoria de transporte linear, na qual a luz é tratada como um conjunto de fótons se propagando através de um meio, que por sua vez é caracterizado pelos seus coeficientes de absorção e de espalhamento, contendo possivelmente regiões discretas de não-homogeneidade. Nesse modelo, apenas as interações entre as partículas de luz e o meio são levadas em conta, sendo desprezados os efeitos de polarização. O transporte de fótons num meio denso é governado por uma aproximação das equações de Maxwell, conhecida como equação de transporte radiativa (RTE), ou equação de transporte de Boltzmann:

$$\left(\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \hat{\Omega} + \mu_t(\vec{r}) \right) L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \mu_s(\vec{r}) \oint f(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}') L(\vec{r}, \hat{\Omega}', t) d\hat{\Omega}' + Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \quad (2.1)$$

onde L é a radiância (número de fótons por unidade de volume) na posição \vec{r} , direção $\hat{\Omega}$, e tempo t ; v representa o módulo da velocidade do fóton no meio, μ_t é o coeficiente de transporte óptico, dado pela soma dos coeficientes de absorção e espalhamento, $f(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}')$ é a função de fase de espalhamento³, e $Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t)$ representa um termo de fonte, ou a fonte de

³A função de fase de espalhamento dá a probabilidade de um fóton viajando na direção $\hat{\Omega}$ ser espalhado na direção $\hat{\Omega}'$.

luz na posição \vec{r} no tempo t , viajando na direção $\hat{\Omega}$, neste caso. A equação 2.1 nada mais é do que uma equação de conservação de energia, estabelecendo que, para um instante de tempo t qualquer, a quantidade de fótons saindo de um certo elemento de volume (lado esquerdo da equação) é igual ao número de fótons entrando nesta mesma região (lado direito da equação). Uma derivação detalhada desta equação, raramente encontrada na literatura, é dada no Apêndice A.

Soluções analíticas da equação de transporte só são possíveis para meios altamente simétricos e simples, o que não é o caso de meios biológicos, especialmente o cérebro. Uma forma alternativa é considerar soluções aproximadas, como a aproximação P_N , pela qual a radiância, a função de fase e o termo de fonte são expandidos em harmônicos esféricos Y_l^m , truncando-se a série em $l = N$. Esta aproximação resulta, porém, num custo computacional muito alto para encontrar a solução num volume relativamente grande, como o transporte de fótons no córtex. Quanto maior N , maior o custo computacional. Tomando-se apenas o primeiro termo da expansão, e assumindo que a função de fase de espalhamento independe do ângulo, que o fluxo de fótons varia lentamente, e que todas as fontes envolvidas no problema são isotrópicas, obtém-se a equação de difusão de fótons (Apêndice A):

$$-D(\vec{r}) \nabla^2 \Phi(\vec{r}, t) + v \mu_a \Phi(\vec{r}, t) + \frac{\partial}{\partial t} \Phi(\vec{r}, t) = v Q_0(\vec{r}, t) \quad (2.2)$$

onde

$$\Phi(\vec{r}, t) = \int L(\vec{r}, \hat{\Omega}', t) d\hat{\Omega}' \quad \text{e} \quad D \cong \frac{v}{3\mu'_s} \quad (2.3)$$

representam a fluência (quantidade de fótons por unidade de área por unidade de tempo) e o coeficiente de difusão, respectivamente. A equação 2.2 representa uma solução aproximada para a equação de transporte radiativa, quando a probabilidade de espalhamento de um fóton dentro de um determinado meio é muito maior que a sua probabilidade de absorção.

A aproximação de transporte difusivo de fótons tem sido amplamente utilizada para modelar a propagação da luz no tecido. A hipótese de que a fluência de fótons obedece a

uma equação de difusão em meios altamente espalhadores de luz foi mostrada em vários estudos (Johnson 1970, Furutsu 1980, Groenhuis *et al.* 1983). Modificações na equação que governa o transporte difusivo também têm sido propostas na literatura (Arridge *et al.* 2000, Ripoll *et al.* 2000, Graaff and Rinzema 2001). No entanto, é necessário tomar alguns cuidados em certas situações em que as condições mencionadas acima não se aplicam, como nos locais próximos da fonte, da superfície, de tecidos anisotrópicos e em regiões onde temos alta absorção ou baixo espalhamento. Nesses casos, aproximações de ordens maiores da RTE são necessárias.

Embora as abordagens acima sejam grandes promessas para o problema da descrição da propagação da luz no tecido biológico, são extremamente complexas para implementar e há questões quanto às suas precisões. Uma outra abordagem alternativa, que emprega métodos de Monte Carlo (Wang *et al.* 1995, Boas *et al.* 2002), envolve implementações conceitualmente mais simples e é baseada em poucas hipóteses, porém com um alto custo computacional. Como qualquer método de Monte Carlo, estes métodos calculam quantidades físicas baseados na propagação aleatória de um grande número de fótons, a partir de regras locais expressas em termos de distribuições de probabilidades. Em todas as simulações, os fótons são tratados como partículas clássicas, e fenômenos ondulatórios e de polarização são desprezados.

2.3 Determinação da concentração de cromóforos

O princípio da NIRS no cérebro baseia-se em medir a intensidade de luz que atravessa o escalpo, eventualmente chega ao córtex, sofre espalhamento do tecido e atinge um detector também posicionado sobre o escalpo, a alguns centímetros de distância da fonte de luz (Figura 2.2(a)). Esta em geral é uma fonte de laser com comprimento de onda no NIR e potência extremamente baixa (da ordem de 15 mW). Naturalmente, a trajetória realizada é diferente para cada fóton, criando um perfil de sensibilidade de luz detectada em relação ao tecido biológico (Figura 2.2(b)).

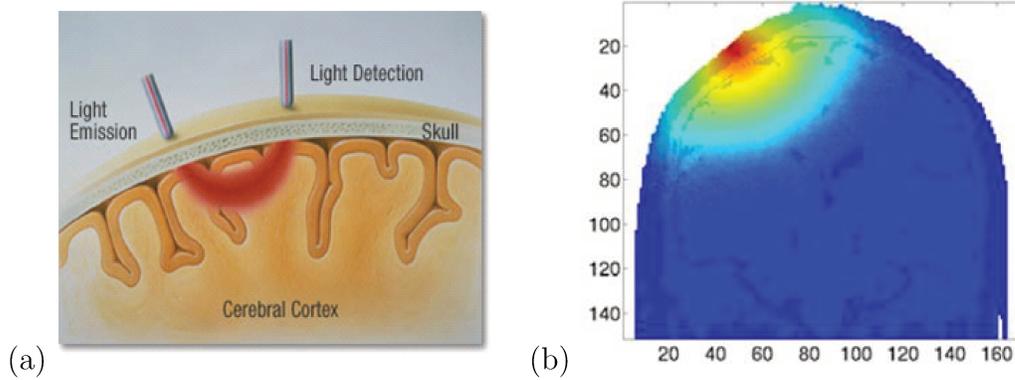


Figura 2.2: (a) Diagrama esquemático da metodologia NIRS; (b) Perfil de sensibilidade para um par fonte-detector calculado por simulação de Monte Carlo, sobreposto numa imagem anatômica obtida por MRI (retirado de Boas et al. 2002).

As propriedades de espalhamento e absorção do tecido, determinantes para o perfil de sensibilidade, são dependentes do comprimento de onda (Figura 2.3). Para $650 \leq \lambda \leq 950$ nm (região utilizada para experimentos no cérebro), os cromóforos dominantes no meio são HbO e HbR, de forma que o coeficiente de absorção do tecido pode ser escrito como uma superposição dos coeficientes de absorção de seus principais cromóforos:

$$\mu_a(\lambda) = \epsilon_{HbO}(\lambda) c_{HbO} + \epsilon_{HbR}(\lambda) c_{HbR} \quad (2.4)$$

onde ϵ_i e c_i indicam o coeficiente de extinção e a concentração do cromóforo i , respectivamente. A equação 2.4 mostra que, dados os coeficientes de extinção dos cromóforos, é possível estimar as concentrações de hemoglobina no cérebro através de medidas do coeficiente de absorção para, pelo menos, dois comprimentos de onda diferentes⁴.

A variação no coeficiente de absorção pode ser calculada a partir da variação normalizada da intensidade de luz incidente num detector, denotada pela densidade óptica (OD).

⁴Pode-se também obter a concentração de outros cromóforos secundários, como citocromo oxidase (Wobst et al. 2001), incluindo sua contribuição no cálculo do coeficiente de absorção da equação 2.4. Neste caso, para o sistema ainda ser determinado, seriam necessárias medidas desta grandeza para, pelo menos, três comprimentos de onda diferentes.

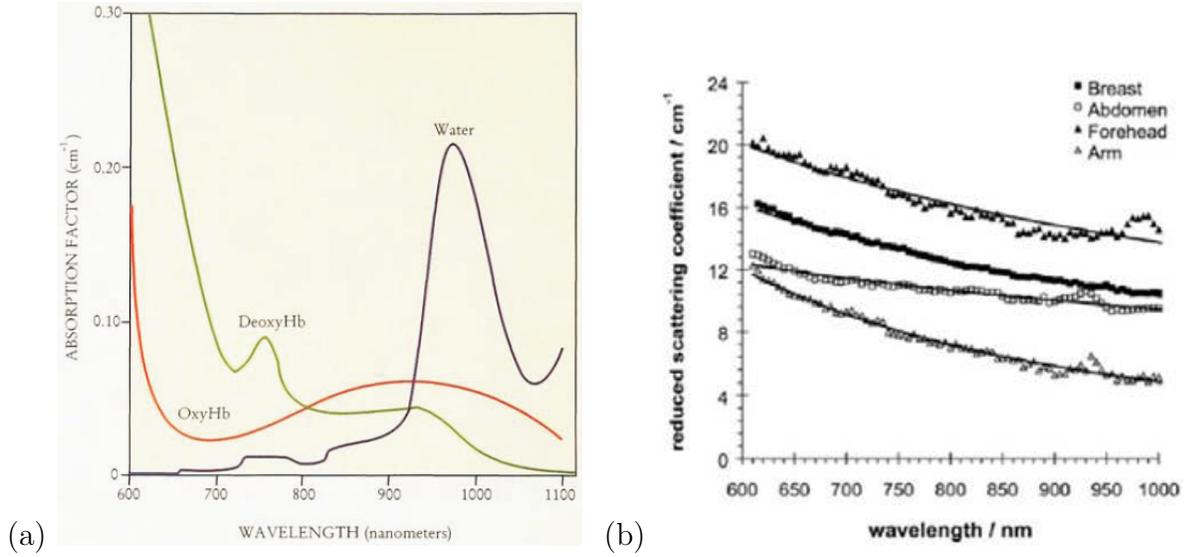


Figura 2.3: Espectro de (a) absorção dos principais cromóforos presentes no cérebro e de (b) espalhamento de diferentes regiões do corpo (retirado de Huppert 2007a).

A lei de Beer-Lambert estabelece que a OD num detector i é proporcional ao coeficiente de absorção:

$$\Delta OD_i(t, \lambda) = -\log \left(\frac{\Phi_{ij}(t, \lambda)}{\Phi_{ij}(0, \lambda)} \right) = \int_{\Gamma} \Delta \mu_a(t, \lambda) d\vec{r} \quad (2.5)$$

onde a fluência $\Phi_{ij}(t, \lambda)$, definida pela equação 2.3, descreve a luz emitida na fonte j , com comprimento de onda λ , e que é observada no detector i , no instante de tempo t . A integral na equação é uma integral de caminho sobre todo o conjunto de trajetórias possíveis Γ para os fótons através do tecido. Em geral, Φ_{ij} é proporcional à amplitude do sinal medido. No entanto, esta hipótese assume uma linearidade operacional do equipamento, o que nem sempre é verdade. Uma solução é normalizar a fluência, de forma que possamos negligenciar certas características do instrumento (eficiência do detector, estágios de amplificação, potência do laser, efeitos de temperatura). O preço a pagar é a estimativa de valores relativos, e não absolutos, para variações na absorção do meio.

Durante uma ativação cerebral, variações nas concentrações de HbO e HbR resultam em variações na absorção da luz dentro do tecido. Para medidas hemodinâmicas funcionais

típicas, assume-se que essas variações são pequenas comparadas com o coeficiente de absorção do meio, e insuficientes para perturbar o caminho da luz através do tecido. Assim, podemos trocar a integral de caminho na equação 2.5 pela multiplicação de um livre caminho médio L_{ij} (Boas *et al.* 2004a). Generalizando esta condição para um conjunto discreto de elementos de volume, temos

$$\Delta OD_i(t, \lambda) = \sum_{j=1}^N \Delta \mu_{a,j}(t, \lambda) \cdot L_{ij}(\lambda) \quad (2.6)$$

A equação acima, derivada da lei de Beer-Lambert, é válida apenas na ausência de espalhamento, o que está longe de ser o caso para nosso objeto de estudo (Kocsis *et al.* 2006). Como, em geral, o caminho médio da luz depende das propriedades de espalhamento do tecido, usamos a lei de Beer-Lambert modificada para contabilizar estes efeitos e levar em conta a propagação difusiva da luz (Cope and Delpy 1988), que inclui um fator de caminho diferencial adicional (l_{DPF}). Desta forma, a densidade óptica pode ser aproximada por

$$\Delta OD_i(t, \lambda) = \sum_n \epsilon_n(\lambda) \Delta c_n(t) L_{ij}(\lambda) l_{DPF}(\lambda) \quad (2.7)$$

onde a variação de concentração do n -ésimo cromóforo, Δc_n , pode ser encontrada através de medidas de intensidade em função do tempo para n diferentes comprimentos de onda. Em particular, se $n = 2$ podemos resolver o sistema resultante da equação 2.7 e estimar $\Delta c_{HbO}(t)$ e $\Delta c_{HbR}(t)$, simultaneamente. A soma destas duas grandezas dá a variação de hemoglobina total, $\Delta c_{HbT}(t)$, que é proporcional à variação de volume sanguíneo, ΔCBV , na região cerebral analisada (Boas *et al.* 2003).

Uma limitação dos experimentos de NIRS realizados com iluminação contínua reside no fato de medir apenas variações relativas de oxigenação do tecido. Uma quantificação absoluta depende do conhecimento do caminho diferencial e de efeitos de volume parcial, cujos valores reais não são disponíveis, principalmente levando-se em consideração as diferentes estruturas cerebrais pelas quais a luz passa. Ainda assim, esta é uma técnica bastante eficaz para detectar zonas de ativação cerebral.

2.4 Reconstrução da imagem

Quando utilizamos mais de um comprimento de onda e mais de um detector, a equação 2.7 pode ser escrita na forma matricial $\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x}$. Uma imagem óptica é reconstruída pela inversão desta equação, onde $\Delta\mu_a$ ou Δc_n (vetor \mathbf{x}) é determinado a partir do conjunto de medidas ópticas (vetor \mathbf{y}) e do perfil de sensibilidade, dado pela matriz \mathbf{A} . Esta é a maior limitação e desvantagem da tomografia óptica, pois o problema a ser resolvido é mal-condicionado (a matriz \mathbf{A} não pode ser invertida diretamente) e indeterminado (há mais variáveis que medidas).

Os problemas acima limitam a aplicabilidade dos modelos de transporte de luz no tecido, apesar de várias técnicas para a reconstrução de imagens ópticas estarem disponíveis na literatura (Arridge 1999, Boas *et al.* 2001, Gibson *et al.* 2005). A maioria das imagens de ativação ópticas publicadas até o momento tem sido produzida pela análise da resposta hemodinâmica (HRF) medida através dos pares de fontes e detectores. Nesse caso, a inversão do problema torna-se bem mais simples. Por exemplo, para geometrias com uma disposição de fontes e detectores que leva em consideração os primeiros vizinhos apenas (cada detector “enxerga” apenas a fonte mais próxima), a técnica de retro-projeção ponderada fornece uma solução aproximada para o problema inverso:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}\mathbf{S})^T \mathbf{y} \quad (2.8)$$

onde a matriz diagonal \mathbf{S} (matriz de pesos) normaliza a matriz \mathbf{A} . O objetivo desta técnica é fazer uma interpolação linear de \mathbf{x} entre os valores do vetor \mathbf{y} (Boas *et al.* 2004b).

Uma outra solução alternativa é contornar a singularidade da matriz \mathbf{A} utilizando a matriz inversa de Moore-Penrose, que oferece um processo de inversão mais eficiente se \mathbf{A} é indeterminado. Neste caso, o problema inverso linear pode ser expresso como:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}^T (\mathbf{A}\mathbf{A}^T + \alpha v_{max} \mathbf{I})^{-1} \mathbf{y} \quad (2.9)$$

onde v_{max} é o máximo autovalor de $\mathbf{A}\mathbf{A}^T$, \mathbf{I} é a matriz identidade e α é um parâmetro de normalização definido arbitrariamente (Arridge 1999, Boas *et al.* 2004b).

No entanto, este método de inversão limita a resolução das imagens ópticas à distância entre fontes e detectores, que é tipicamente 2-4 cm. O fato de o problema ser indeterminado também é crítico, pois implica na não-unicidade da solução, o que significa que diferentes imagens equivalentes podem levar ao mesmo vetor de dados ou observação. Uma forma de contornar o problema é incorporar informações adicionais como vínculos ao problema da reconstrução. Alguns estudos sugerem, por exemplo, o uso de imagens estruturais de ressonância magnética (Boas and Dale 2005, Huppert *et al.* 2006a). A melhor resolução espacial desta técnica pode restringir as soluções factíveis do problema e/ou identificar a solução única para a reconstrução óptica. A aplicação de métodos como este ainda é motivo de grande debate, sendo necessárias validações experimentais e estudos mais profundos.

2.5 Instrumentação

Comparada às principais técnicas disponíveis em neurociência funcional, a NIRS apresenta várias vantagens devido ao seu baixo custo, portabilidade, flexibilidade, especificidade bioquímica e alta sensibilidade para detectar pequenas concentrações. Sua principal característica é a alta resolução temporal, da ordem de milisegundos. A resolução espacial e a profundidade de penetração, entretanto, são intrinsecamente limitadas devido à necessidade da propagação da luz através do tecido, não passando de alguns centímetros. Independentemente de suas características principais, três aspectos são fundamentais num sistema óptico: o método de excitação, os comprimentos de onda utilizados e a geometria fonte-detector.

2.5.1 Métodos de excitação

Quanto ao método de excitação do tecido, podemos identificar três esquemas: excitação no domínio do tempo, excitação no domínio da frequência e iluminação contínua

(Figura 2.4). Abaixo, uma breve introdução sobre cada um destes esquemas (um excelente artigo de revisão no assunto pode ser encontrado em Yodh and Boas 2003).

No domínio do tempo, também conhecida como espectroscopia resolvida no tempo, aplicam-se pulsos muito curtos de luz, tipicamente da ordem de 10^{-12} segundos, e detecta-se a distribuição temporal da chegada dos fótons após se propagar pelo tecido. A forma desta distribuição está relacionada com os coeficientes de absorção e espalhamento do tecido. Assim, é possível medir quantitativamente estes parâmetros, além de se ganhar informação a respeito do caminho óptico no tecido. Embora esta técnica seja a mais adequada para explorar quantitativamente as propriedades do tecido, trata-se de uma metodologia com relação sinal-ruído (SNR) muito baixa, uma vez que o objeto medido está relacionado com o número de fótons num intervalo de tempo extremamente pequeno. Além disso, o custo do aparato optoeletrônico necessário para tal detecção é bastante elevado, além do tempo de aquisição ser relativamente alto (atualmente, alguns minutos).

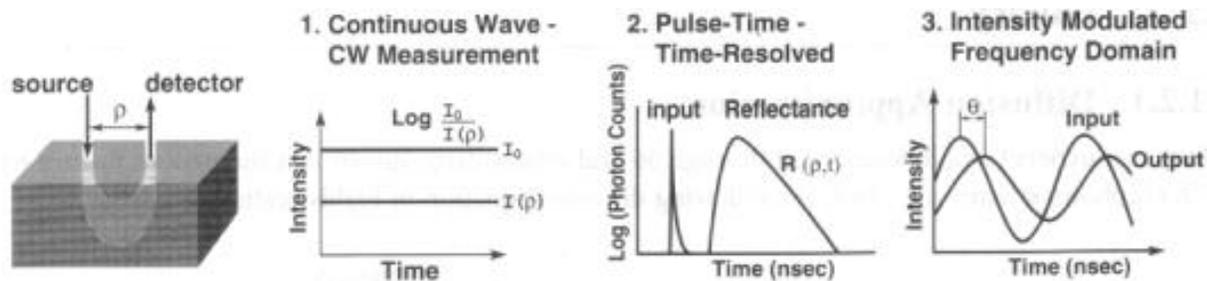


Figura 2.4: Representação do sinal observado em cada um dos três métodos de excitação no tecido (retirado de Yodh and Boas 2003).

A espectroscopia no domínio da frequência tem por objetivo modular a amplitude da luz numa certa frequência f , produzindo uma onda de difusão dentro do meio. A amplitude e a fase desta onda são os parâmetros observáveis, e estão relacionados com os parâmetros ópticos do meio. Cabe salientar que, embora a instrumentação para este tipo de experimento seja bem diferente daquela utilizada para experimentos no domínio

do tempo, estes dois modos de excitação do tecido estão relacionados entre si por uma transformada de Fourier, e são portanto equivalentes (no caso em que pode-se varrer diferentes frequências de modulação no domínio da frequência).

A técnica mais simples e mais fácil, além de mais barata, é a excitação com iluminação contínua (CW). Por isso tudo, é a que mais vem sendo utilizada em estudos funcionais cerebrais. Neste caso, a intensidade da fonte é constante⁵, e a amplitude transmitida é medida em função da distância de separação fonte-detector e/ou do comprimento de onda. Assim, a técnica CW é um caso especial do domínio da frequência quando $f \rightarrow 0$. Este método permite altas taxas de aquisição de medidas (até 100 Hz), sendo capaz de atingir uma resolução temporal de até 10 ms, mas a perda da informação do tempo de chegada dos fótons no detector torna a quantificação das propriedades ópticas do tecido (e, conseqüentemente, da concentração de cromóforos) mais difícil. Contudo, geralmente o interesse imediato é nas variações relativas destas grandezas. Sistemas que operam em CW apresentam alto SNR, se comparado com as metodologias anteriores.

Um ponto importante, independentemente do método de excitação escolhido, é encontrar os comprimentos de onda ótimos, dado o espectro de absorção dos principais absorvedores do tecido. Em geral, a escolha é feita entre $670 \leq \lambda \leq 900$ nm, pois abaixo desta faixa a luz é fortemente absorvida pela molécula de hemoglobina, e acima desta região é a água a principal molécula absorvedora. A fim de maximizar a sensibilidade à variação de concentração de hemoglobina, é necessário escolher um comprimento de onda antes e outro depois de 805 nm, ponto onde os coeficientes de absorção de HbO e HbR se equivalem (Figura 2.3(a)). Geralmente, é comum a escolha de 830 nm para o ponto depois de 805 nm, uma vez que a sensibilidade de fotomultiplicadoras decai rapidamente acima de 840 nm. O outro comprimento de onda depende do instrumento disponível, mas vários estudos têm chegado ao consenso de que comprimentos de onda de 690 ou 750 nm minimizam erros sistemáticos ou aleatórios (Strangman *et al.* 2003, Sato *et al.* 2004).

⁵Em alguns casos a amplitude da luz emitida é modulada em frequências da ordem de dezenas de kHz, como forma de codificar a informação proveniente de diferentes fontes em cada detector.

2.5.2 Disposição de fontes e detectores

A geometria está relacionada com o posicionamento dos optodos, tanto as fontes de lasers quanto os detectores, e caracteriza a localização do sinal óptico medido. As duas formas mais comuns de posicionamento são a transmissiva, onde fontes e detectores são posicionados em superfícies opostas do tecido, e a reflexiva, na qual ambos ficam no mesmo lado da superfície.

Cabe aqui ratificar certas definições: em estudos ópticos, a fonte de luz geralmente é um laser, enquanto um detector nada mais é do que um fotodiodo⁶. Uma fonte refere-se à localização de um optodo que fornece luz nos diferentes comprimentos de onda disponíveis; assim, uma fonte é composta por 2 lasers com comprimentos de onda diferentes. Como cada detector pode “enxergar” mais de uma fonte, o sinal óptico medido em cada detector devido a uma única fonte é denominado de canal.

A utilização de diferentes canais através da combinação de fontes e detectores também é assunto de interesse em estudos ópticos, e importante para a otimização da análise funcional que se pretende fazer. O número de canais dos sistemas disponíveis tem aumentado com o tempo. Os equipamentos atuais têm em média 8 fontes e 16 detectores, sendo que aparelhos tipo CW com o dobro de optodos já estão disponíveis no mercado há algum tempo. Como a resolução das imagens ópticas é proporcional à separação fonte-detector, que tipicamente varia entre 2 - 4 cm, um maior número de optodos pode levar a uma maior cobertura de uma determinada região a se estudar. Um ponto de estudo extremamente importante é a localização destes optodos, a fim de gerar o maior número de canais possível. Isto ajuda na solução do problema inverso para a obtenção de imagens ópticas, como descrito na Seção 2.4. Uma proposta atraente é a utilização de geometrias que permitam adquirir dados de canais superpostos, o que aumentaria a resolução espacial do sistema. Alguns estudos vêm descrevendo geometrias cada vez mais interessantes. Re-

⁶Estudos ópticos em animais de pequeno porte, como ratos, também podem ser feitos com lâmpadas de arco de Xenônio ou similar como fontes de luz, e câmaras CCD são geralmente utilizadas como detectores.

centemente um deles mostrou que fontes e detectores dispostos numa forma hexagonal, com a fonte no meio, possibilita o aumento da resolução espacial por um fator de aproximadamente 2 (Boas *et al.* 2004b). No entanto, para estudos de espectroscopia, em que a resolução temporal é explorada majoritariamente, geometrias planas e simples ainda são muito utilizadas.

2.5.3 Construção e caracterização do CW6

Como parte do desenvolvimento deste trabalho, desenvolvemos o Continuous-Wave 6 (CW6), junto à TechEn, Inc. (Milford, MA, EUA). Como o próprio nome diz, o CW6 é um equipamento que utiliza excitação contínua para detectar a luz proveniente de até 16 fontes diferentes. Os 32 lasers de diodo - 16 em 690 nm (Hitachi HL6738MG) e outros 16 em 830 nm (Hitachi HL8325G) - são modulados em frequências diferentes, entre 6.4 e 12.6 kHz divididas igualmente em passos de 200 Hz. Os detectores, fotodiodos avalanche (APD, Hamamatsu C5460-01), adquirem luz de todas as fontes simultaneamente, em paralelo. Após cada APD há um estágio de amplificação, seguido de um primeiro filtro passa-alta com frequência de corte de 500 Hz, a fim de remover fontes de interferência como luz ambiente e ruídos 1/f. Em seguida, há um novo estágio de ganho programável para manter os sinais de todos os APDs no mesmo nível, para finalmente passar por um filtro passa-baixa com frequência de corte de 16 kHz. Cada detector é amostrado em 41.7 kHz através de um cartão de aquisição de dados (National Instruments, NI6052E), conectado a um computador. Toda a eletrônica está contida numa caixa relativamente pequena (50 x 40 x 50 cm^3), pesando aproximadamente 45 kg (Figura 2.5(a)).

A grande vantagem do CW6 está na distribuição das frequências de modulação, de forma a otimizar o sistema e reduzir eventuais erros de medida. Além disto, o estágio de demodulação e re-amostragem é feito em tempo real, tornando possível acompanhar o sinal e nível de ruído no momento da aquisição. Todo o sistema é controlável e programável via software, criado por nós em MatLab (Mathworks Inc., Sherborn, MA, EUA).

Para caracterizar a eletrônica do sistema, realizamos um experimento de transmitância através de um tubo contendo papel higiênico picado (material espalhador). Entre as extremidades do tubo, foram posicionados filtros ópticos de densidade neutra, com densidade óptica⁷ variável entre 0.1 e 5 (Figura 2.5(b)). Após analisar todas as combinações entre fontes e detectores, verificou-se que o nível de ruído do sistema é de aproximadamente 50 dB, enquanto o de saturação é da ordem de 140 dB, garantindo uma faixa dinâmica de operação maior que 80 dB (Figura 2.5(b)). Este valor é desejável, uma vez que passa a permitir a aquisição de diferentes níveis de sinais com bom SNR.

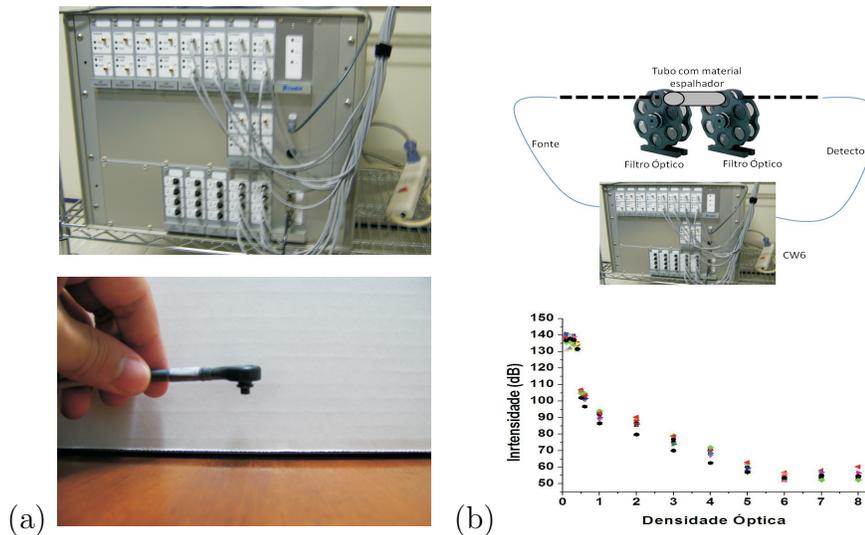


Figura 2.5: (a) Foto do equipamento CW6 (em cima) e do perfil de um optodo (embaixo). (b) Esquema experimental (em cima) e faixa dinâmica (embaixo) medida para alguns detectores do equipamento.

Conhecidos os limites superior e inferior de operação, testamos a sensibilidade do equipamento através de um experimento controlado. Dentro de uma caixa de metal, colocamos uma pequena esfera de vidro com 2 cm de diâmetro conectada a dois tubos, também de vidro, que terminavam num reservatório contendo uma mistura de leite e água,

⁷A densidade óptica (OD) de um filtro é dada por $OD = \log_{10}(1/T)$, onde T é a transmitância do filtro.

de forma análoga a Joseph *et al.* (2006). Uma bomba fazia a mistura circular dentro do tubo e, conseqüentemente, da esfera (Figura 2.6(a)). Toda a caixa também continha a mesma solução, e no seu topo posicionamos optodos conectados ao CW6 através de fibras ópticas de plástico, de modo a formar uma geometria hexagonal, com as distâncias entre uma fonte e o detector mais próximo e o segundo mais próximo fixas em 2 e 4 cm, respectivamente. A esfera estava posicionada há aproximadamente 1,7 cm abaixo dos optodos.

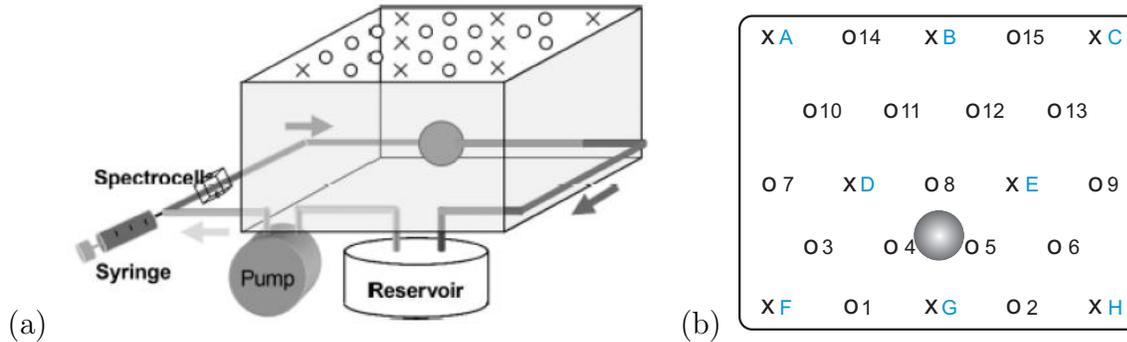


Figura 2.6: (a) Montagem experimental para realizar o experimento controlado. (b) Geometria dos optodos no topo da caixa de metal, disposta na forma hexagonal, com a projeção da esfera localizada no interior. Letras (Números) indicam as fontes (detectores).

Para alterar o coeficiente de absorção da esfera, injetamos tinta preta dentro do tubo através de uma seringa durante 8 segundos, a cada 30 segundos, durante 5 minutos. Repetimos esta série 2 vezes. A variação da intensidade da luz em cada detector, para cada comprimento de onda, foi medida continuamente a uma taxa de 25 Hz. Em seguida, os dados foram filtrados usando um filtro passa-banda entre 0,01 e 1,0 Hz, e convertidos em OD. A variação de OD nos dois comprimentos de onda entre a fonte D e o detector 5 (FD, D5) foi calculada após cada injeção de tinta, e sua média é mostrada na Figura 2.7(a). Por fim, considerando os dois primeiros vizinhos, utilizamos o método de retro-projeção para obter imagens ópticas de maior variação ΔOD nos dois comprimentos de onda. A Figura 2.7(b) mostra as imagens obtidas no plano $z = 1,7$ cm, que revelam uma

excelente concordância espacial entre a variação de μ_a estimada e a localização real da esfera (indicada pelo círculo preto).

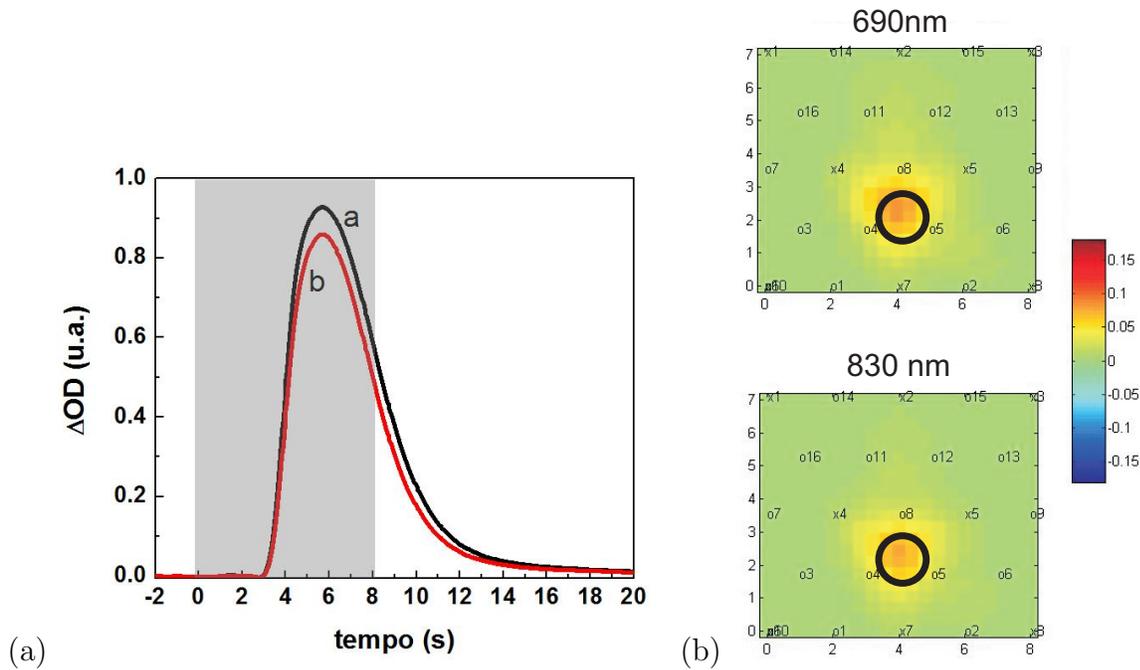


Figura 2.7: (a) Variação de OD medida nos optodos situados em cima da esfera (FD, D5), para $\lambda = 690\text{nm}$ (curva b) e 830nm (curva a). A região hachurada indica o tempo no qual a injeção de tinta ocorreu. (b) Reconstrução da imagem óptica (ΔOD) no plano perpendicular à esfera, para os dois comprimentos de onda.

Embora puramente ilustrativo, este resultado mostra os princípios e os principais objetivos das análises ópticas obtidas através de NIRS e DOI em neurociência funcional: a partir de medidas de intensidade da luz, é possível estimar variações nas densidades ópticas devido às variações nos coeficientes ópticos do meio. É possível encontrar a forma temporal (dinâmica) desta resposta, e reconstruir a imagem tomográfica a partir das respostas calculadas nos diversos pares fontes/detectores.

Capítulo 3

Experimentos ópticos de ativação funcional em humanos

Ao contrário de outras técnicas, como fMRI, ainda não há um protocolo bem definido a ser seguido em experimentos ópticos com NIRS. Assim, torna-se importante o entendimento de todo o protocolo experimental, bem como o embasamento teórico da técnica, a fim de se obter da série temporal informações relevantes para o estudo da hemodinâmica do potencial evocado.

Em experimentos de caracterização, relativamente simples e bem controlados, como o apresentado no capítulo anterior, a análise e interpretação do sinal óptico é bem simples. Mas quando a amostra passa a ser o tecido biológico, várias outras fontes de ruído podem aparecer, e o tratamento de dados precisa estar muito bem estabelecido.

Uma vez amostrada a uma resolução temporal razoável (normalmente, 10 a 25 Hz), o pré-processamento dos dados é feito baseado nos métodos de análise de séries temporais mais comuns. Primeiro a partir da transformada de Fourier da série, é possível aplicar filtros capazes de eliminar frequências não úteis para a hemodinâmica do sinal. Dependendo do tipo de experimento, faz-se necessário o uso de métodos de estatística multivariada, como a análise de componentes principais (PCA). Nesse caso, é possível eliminar as com-

ponentes principais da série, geralmente extraídas da matriz de covariâncias, e que não estão relacionadas com a resposta hemodinâmica, mas sim com outras fontes de sinal (Franceschini *et al.* 2006).

Dentre estes outros tipos de sinal também detectados pelos optodos destacam-se as variações neurofisiológicas, como pulsação cardíaca, sinais respiratórios (resp) e variações da pressão sangüínea (PS), presentes no escalpo e nos tecidos subseqüentes. Devido à alta sensibilidade de detecção de variações da absorção, aliada à alta resolução temporal, a NIRS torna-se uma técnica muito sensível à neurofisiologia cerebral. Se por um lado este fato permite a utilização de métodos ópticos também para o estudo da regulação fisiológica no cérebro, por outro é um empecilho à determinação da resposta hemodinâmica. Neste capítulo, apresentamos a metodologia empregada neste trabalho para a determinação da dinâmica da oxigenação (HbO, HbR e HbT) como resposta hemodinâmica devido a uma ativação funcional. Exemplos de vários tipos de experimentos diferentes, todos realizados durante este trabalho, procuram explorar diferenças nas características destas curvas, e servem como motivação de experimentos de neurociência funcional com métodos ópticos. Por fim, o estudo de estímulos paramétricos, onde freqüência, amplitude e/ou duração são variados, também é assunto de interesse para um melhor entendimento da relação neuro-vascular-metabólica.

3.1 Obtenção da resposta hemodinâmica

Se olharmos a curva temporal da intensidade de luz que atinge um detector, proveniente de uma única fonte, teremos uma curva análogo à da Figura 3.1. Uma decomposição de freqüências presentes no sinal mostra um pico em aproximadamente 1 Hz, que é justamente a região da freqüência cardíaca. Isto mostra a sensibilidade deste sinal para observar flutuações fisiológicas.

Desta forma, pode-se representar o sinal óptico como uma soma linear dos efeitos sistêmicos relacionados com a fisiologia e eventuais alterações provocadas por um estímulo,

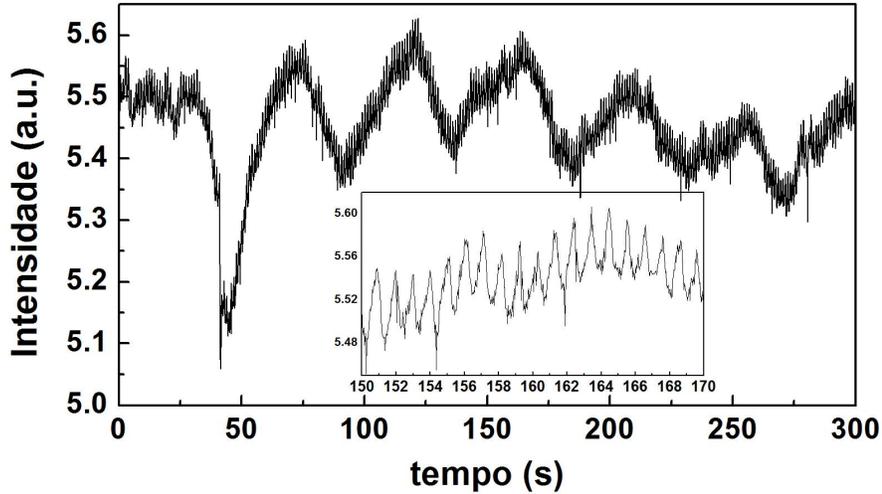


Figura 3.1: *Intensidade da luz que chega num detector, proveniente de uma única fonte, ao longo de uma série. No quadro menor, um zoom numa pequena região temporal, mostrando as variações cardíacas, com período de aproximadamente 1 s.*

ou seja,

$$Y = f \otimes U_{est} + f_{resp} \otimes U_{resp} + f_{PS} \otimes U_{PS} + \dots \quad (3.1)$$

Nessa equação, Y representa o sinal óptico medido e \otimes representa a operação de convolução; U_i é o i -ésimo regressor que contribui para o sinal, que pode ser tanto variações fisiológicas quanto o desenho do estímulo (est); as funções f representam as funções de transferência (função resposta) de cada um destes regressores para a observação óptica.

Assim, se as contribuições fisiológicas forem ignoradas, a resposta hemodinâmica (no caso óptico, HbO e HbR) pode ser calculada através da simples deconvolução do sinal óptico pela série temporal de marcação do estímulo aplicado. No entanto, se regressores fisiológicos forem adquiridos simultaneamente com o sinal óptico - com o auxílio de oxímetros, respirômetros e medidores de pressão -, estes podem ser usados como informações *a priori* na equação 3.1, e a resposta hemodinâmica será determinada de forma mais precisa e com melhor SNR.

Em resumo, métodos padrões para análise funcional de NIRS são bastante diferentes

daqueles utilizados em fMRI. Poucos são os trabalhos que utilizam modelos lineares gerais em óptica (Plichta *et al.* 2007, Cohen-Adad *et al.* 2007), método amplamente utilizado em fMRI. Em particular, fMRI mede um tipo de sinal (o sinal BOLD) e uma única função “canônica” permite a detecção de respostas funcionais e o respectivo mapeamento da ativação. Mesmo que a função canônica e a verdadeira resposta funcional não coincidam, ainda assim é possível mapear a ativação parametricamente. Por outro lado, deve-se tomar cuidado ao escolher essa(s) função(ões) canônica(s) em experimentos ópticos, uma vez que NIRS mede múltiplas respostas (HbO e HbR) e a interpretação da variação destes parâmetros hemodinâmicos depende diretamente da(s) função(ões) escolhida(s). Este, portanto, é um aspecto importante que ainda requer desenvolvimento metodológico.

3.2 Dinâmica vascular no córtex motor

Sabe-se que a forma da resposta hemodinâmica varia de acordo com a amplitude, duração e frequência do estímulo aplicado. Até mesmo a natureza do estímulo interfere no tipo de resposta vascular para satisfazer as variações dos neurônios. A dinâmica deste tipo de variação, tanto temporal quanto espacial, ainda é bastante estudada em vários casos (Devor *et al.* 2003, Buxton *et al.* 2004).

Para exemplificar as diferenças significativas na resposta hemodinâmica, realizamos um experimento de ativação motora em humanos, no qual os voluntários foram orientados a movimentar sua mão dominante, fazendo o dedo polegar tocar todos os outros dedos, um de cada vez, numa frequência de 1 - 3 Hz, com aproximadamente 80% da força máxima. Para cada indivíduo, o experimento foi realizado com 4 - 6 séries de 6 minutos cada, com um intervalo entre as séries, onde o indivíduo poderia relaxar e se movimentar. Utilizamos ao todo 12 voluntários normais, todos homens, com média de idade entre (26 ± 7) anos: em 5 deles, a duração do estímulo motor foi de 20 segundos, sempre intercalado com 20 segundos de repouso (block design); nos outros 7, aplicamos estímulos de forma aleatória, sempre com 2 segundos de duração (event-related). Todo o procedimento foi aprovado

pelo Comitê de Ética do MGH (Charlestown, MA, EUA).

Para medir a variação hemodinâmica provocada pelo estímulo, utilizamos o CW6 e posicionamos os optodos numa geometria hexagonal (Seção 2.5.3), localizada acima do córtex motor contra-lateral ao lado dominante, onde esperávamos encontrar diferenças significativas de variação de oxigenação. Os dados foram amostrados a 10 Hz, filtrados entre 0,02 - 0,5 Hz com um filtro passa-banda, e depois convertidos em variações de concentração de oxi- e deoxi-hemoglobina através da lei de Beer-Lambert modificada, usando uma correção de caminho $l_{DPF} = 6$ para ambos os comprimentos de onda. A resposta hemodinâmica em cada um dos canais foi calculada através da deconvolução do sinal óptico medido pelo vetor composto pelo início de cada tentativa da atividade, e a média desta resposta foi calculada para cada canal, ao longo de todas as séries, em cada indivíduo. Comparando as respostas obtidas nos diferentes canais, definimos uma região de interesse (ROI) representada pelos canais com maiores variações hemodinâmicas ($P > 0,05$) para cada indivíduo.

A Figura 3.2 mostra as variações de oxigenação para dois indivíduos, durante o período da atividade motora. Todas as curvas foram normalizadas pela maior variação obtida, de forma que a escala está sempre entre -1 e 1. Enquanto em certos locais da geometria não há variação de concentração durante a duração do estímulo (indicada pela cor verde), em algumas regiões nota-se um aumento de [HbO] e uma diminuição, com menor intensidade, de [HbR], levando a um aumento de [HbT]. Esse resultado é esperado e encontra-se de acordo com a literatura (Villringer and Dirnagl 1997, Boas *et al.* 2001, Nolte 2002), devido ao acoplamento neuro-vascular-metabólico comentado na Seção 1.2.2. As imagens também evidenciam uma diferença no padrão espacial de variação destes cromóforos; durante 2 segundos, o estímulo motor provoca uma alteração bem localizada, mas quando a duração é dez vezes maior, toda uma região envolta do córtex motor sofre uma alteração significativa. Em resumo, quanto maior a duração do estímulo, maior a região que sofre um aumento de oxigenação, para este tipo de estímulo.

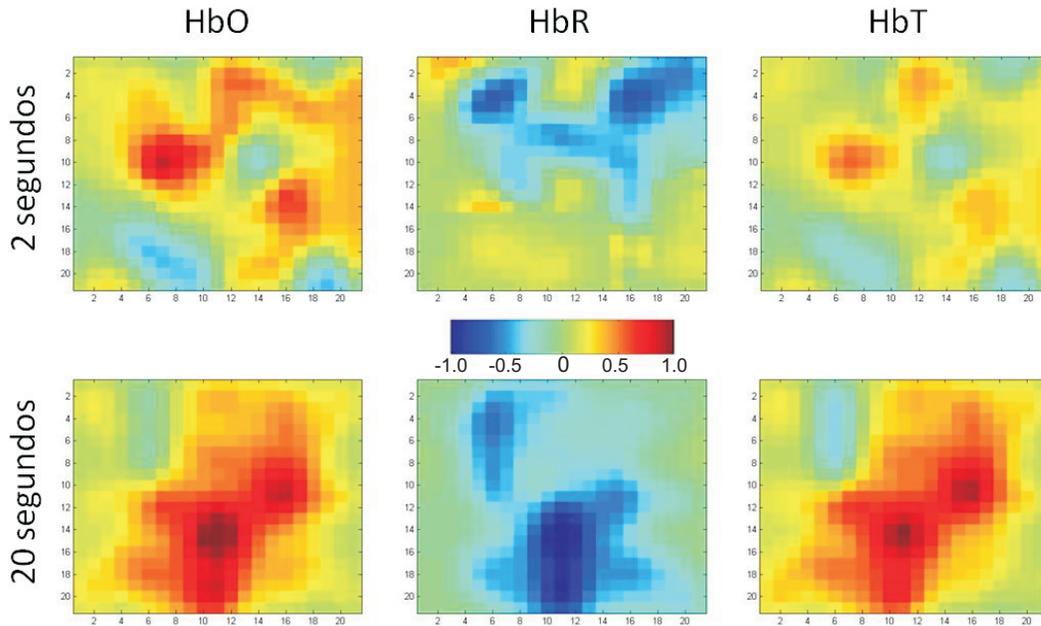


Figura 3.2: *Reconstrução da imagem óptica, mostrando os locais com maiores variações de HbO, HbR e HbT para as duas durações de estímulo estudadas.*

Para entender melhor estas variações de oxigenação em função da duração do estímulo, podemos olhar para a resposta hemodinâmica estimada nas duas condições. A Figura 3.3 mostra a média da HRF na região de interesse, obtida entre os participantes. Como é esperado, a HRF é bem mais lenta, se comparada com a ativação neuronal (que ocorre num tempo da ordem de ms após a aplicação do estímulo), e sua forma é não-linear e dependente da duração do estímulo. Para o caso de 2 s, há uma diminuição de [HbO] e um aumento de [HbR] logo após o início do estímulo. Este comportamento é explicado pela rápida demanda de oxigênio no tecido celular, fazendo com que a [HbR] relativa seja maior numa determinada região durante este período. No entanto, o aumento no consumo de oxigênio faz com que o CBF também tenha uma variação positiva, maior do que o consumo de O_2 no tecido. Assim, a situação se inverte após um certo período, de forma que [HbO] aumenta e [HbR] diminui, em relação ao estado basal. A diferença entre estas variações provoca uma variação positiva na [HbT], que é proporcional ao CBV. No

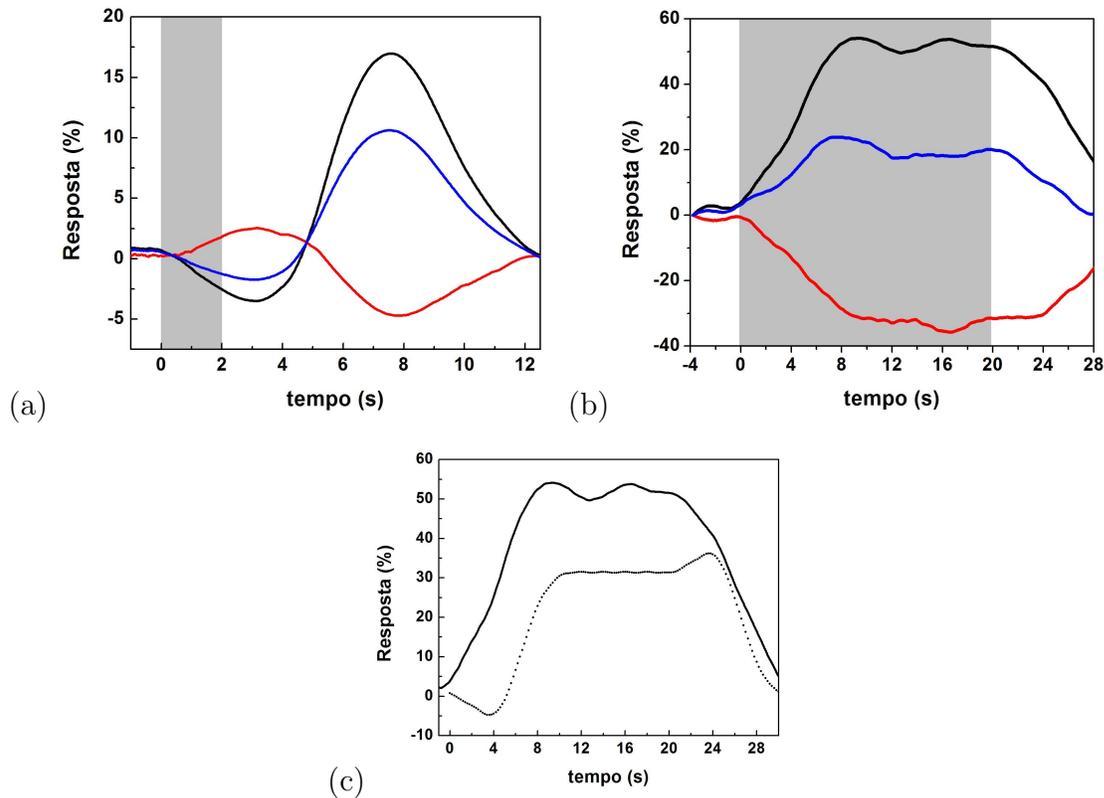


Figura 3.3: Resposta hemodinâmica devido a uma tarefa motora com (a) 2 e (b) 20 segundos de duração, obtida através da média entre os indivíduos; as curvas em preto, vermelho e azul representam variações de HbO, HbR e HbT, respectivamente. (c) Comparação entre a resposta esperada para 20 s de estimulação motora, baseada na superposição da HRF obtida para 2 s de estímulo (curva tracejada) e a verdadeira resposta medida (curva sólida).

caso de 2 s, a oxigenação do tecido retorna ao estado basal aproximadamente 10 segundos depois de terminada a atividade motora.

Quando a duração da atividade é de 20 segundos, a escala temporal a ser observada muda e a dinâmica torna-se bem diferente (Figura 3.3(b)). Neste caso, a [HbO] na região observada atinge um máximo e depois se mantém num nível 50% maior do que o encontrado no estado basal, aproximadamente, antes de retornar a este. A [HbR] também diminui consideravelmente, mas a variação de [HbT] ainda é positiva, da ordem de 20%.

Pode-se testar a não-linearidade da fisiologia do potencial evocado através do princípio de superposição. Se a oxigenação cerebral respondesse de forma linear, então a HRF estimada para um estímulo de 20 s de duração poderia ser obtida através da superposição de HRFs, como a estimada para mesma atividade durante 2 s. A Figura 3.3(c) mostra que esta superposição prevê uma variação de [HbO] menor do que a realmente medida, além de diferenças na dinâmica da curva. Apesar de uma grande discussão acerca do tema, e da formulação de modelos que assumem a linearidade das curvas de oxigenação em relação à duração do estímulo, apresentamos aqui uma evidência da não-linearidade do sistema, assim como outras encontradas na literatura (Friston *et al.* 2000, Devor *et al.* 2007).

3.3 Parametrização funcional do córtex sensorial

A variação de parâmetros (amplitude, duração e frequência) de um certo estímulo pode fornecer detalhes sobre a não-linearidade da resposta hemodinâmica, e mostrar regiões, caso existam, em que a HRF pode ser assumida como linear. Na seção anterior, mostramos que a relação entre a duração de um estímulo e a resposta hemodinâmica no córtex motor é mais complexa do que uma simples superposição da função de transferência correspondente. Nesta seção, pretendemos fazer um estudo mais detalhado do comportamento da HRF em função da parametrização da duração do estímulo aplicado.

Para este estudo, utilizamos como modelo o córtex sensorial, uma vez que é possível ter maior controle sobre a atividade nesta região. Além disso, a organização do córtex sensorial humano tem sido bastante estudada através de estudos de MEG e fMRI (Korvenoja *et al.* 2006, Arienzo *et al.* 2006, Ferretti *et al.* 2007), mostrando o papel de importantes áreas corticais durante sua ativação, como o córtex somatosensorial primário (SI) contralateral e secundário (SII) bilateral, e suas atividades em função da estimulação parametrizada na frequência (Ferretti *et al.* 2007). O córtex sensorial também foi objeto de estudo para o desenvolvimento de uma metodologia para estimar o consumo de oxigênio no cérebro, apresentado no Capítulo 5.

Assim, realizamos aquisições ópticas durante a estimulação do nervo mediano com 14 voluntários normais, com média de idade de (31 ± 7) anos, todos destros e do sexo masculino. O estímulo consistiu em injetar corrente através de eletrodos, que foram posicionados sobre o nervo mediano da mão direita, na altura do pulso (Figura 3.4). A amplitude do estímulo foi tomada tendo o movimento do dedo polegar como referência. A frequência e duração de cada estimulação foi controlada a partir de um gerador de pulsos quadrados (Grass Technologies, West Warwick, RI, EUA), que gerava pulsos de 200 ms com uma corrente máxima de 10 mA. Cada indivíduo foi submetido a 6 seções de 6 minutos cada, onde 30% deste tempo foi destinado à atividade de estimulação, com um intervalo entre estímulos (ISI) aleatório de 4 a 18 s (média de 12 s)¹. A duração de cada estímulo variou entre 1 e 4 s, em intervalos fixos de 1 s, e a frequência do trem de pulsos foi fixada em 4 Hz. Todo o protocolo experimental foi examinado e aprovado pelo Comitê de Ética do Massachusetts General Hospital (Charlestown, MA, EUA), local onde as medidas foram realizadas.

As medidas ópticas foram coletadas usando um sistema óptico de onda contínua (CW4, TechEn Inc.). Os optodos foram dispostos numa geometria retangular, onde 2 linhas com 4 fontes cada (em cada fonte, 2 lasers - 690 e 830 nm) foram intercaladas entre 3 linhas de 5 detectores (Figura 3.5). As variações de pressão sanguínea e respiração cardíaca foram monitoradas durante todo o experimento, e estes dados foram usados na análise da resposta hemodinâmica, a fim de melhorar o SNR da mesma.

Após o experimento, os dados ópticos foram demultiplexados e re-amostrados a 10 Hz, e a intensidade do sinal foi filtrada com um filtro passa-banda entre 0,02 e 0,5 Hz, convertida em OD e, posteriormente [HbO] e [HbR]. Quando necessário, uma análise de componentes principais também foi feita, a fim de filtrar do sinal ruídos devidos aos movi-

¹Um intervalo entre estímulos (ISI) é o tempo decorrido entre dois estímulos consecutivos, e é uma medida importante a ser considerada, a fim de que o processo de deconvolução da HRF não seja mal-condicionado. Uma média de ISI relativamente longa diminui a possibilidade da região cortical sofrer um processo de habituação ao estímulo, alterando assim a resposta hemodinâmica.



O1	O2	O3	O4	O5
	XA	XB	XC	XD
O6	O7	O8	O9	O10
	XE	XF	XG	XH
O11	O12	O13	O14	O15

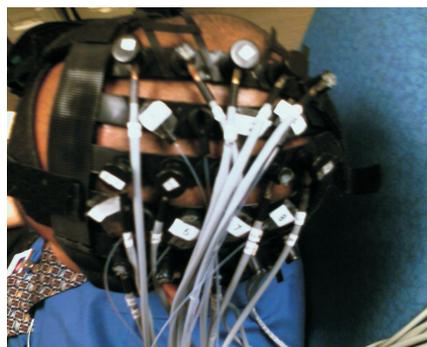


Figura 3.4: *Em cima: gerador de pulsos utilizado para estimulação de nervo mediano. Embaixo: localização do eletrodo na mão direita de um voluntário.*

Figura 3.5: *Posição dos optodos sobre o escalpo de um voluntário, durante o experimento de estimulação do nervo mediano.*

mentos do indivíduo durante a aquisição. A curva de resposta hemodinâmica foi obtida a partir de um processo de deconvolução, considerando respiração e pressão sanguínea como regressores. A partir da resposta encontrada em cada canal, definiu-se uma ROI e calculou-se uma HRF média para cada indivíduo. Para determinar a variação de oxigenação devido à estimulação de nervo mediano, tomamos a média da HRF entre diferentes indivíduos, para cada duração de estímulo. A Figura 3.6(a) mostra o resultado obtido para variações de [HbO] e [HbR]. Nota-se que, à medida que a duração da estimulação aumenta, a amplitude, largura e o tempo para atingir a máxima variação também aumentam, como é esperado, uma vez que estes parâmetros que definem a HRF dependem da duração. Comparado à Figura 3.3(a), que mostra a resposta produzida no córtex motor, vemos que estas diferem significativamente. Embora a resposta vascular à estimulação do nervo mediano seja menos robusta - e, portanto, mais sensível a interferências externas,

produzindo uma HRF com menor SNR -, as Figuras 3.3(a) e 3.6(a) evidenciam diferenças hemodinâmicas que podem ser encontradas nos diversos sistemas que compõem o córtex cerebral.

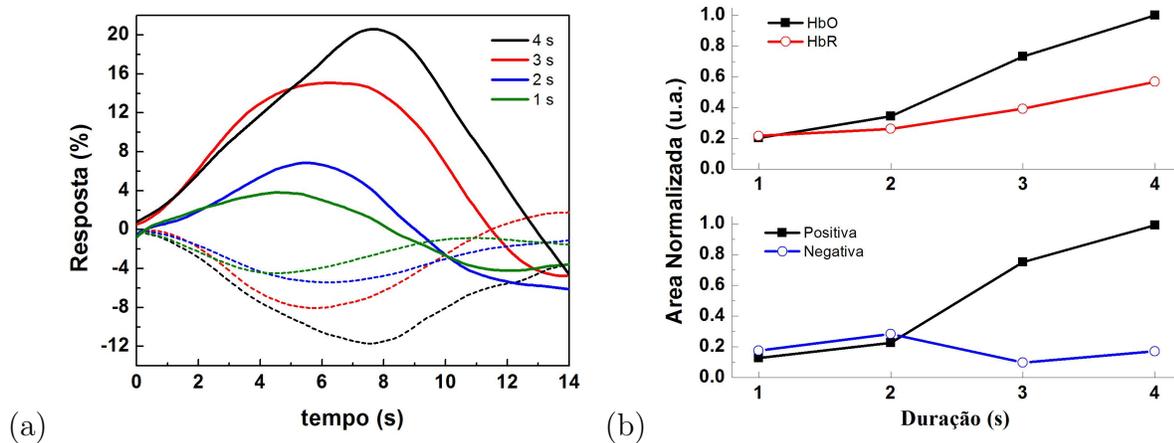


Figura 3.6: (a) Resposta hemodinâmica obtida para estimulação de nervo mediano com 4 tempos de duração diferentes. (b) Relação entre a resposta hemodinâmica e a duração do estímulo. Em cima: área normalizada sob a curva de HbO e HbR, em função da duração. Embaixo: separação das contribuições positiva e negativa da resposta de HbO, em função da duração.

Para verificar como se dá a variação paramétrica de oxigenação no córtex, verificou-se como a área sob as HRFs de [HbO] e [HbR] varia em função da duração da atividade. Quando utilizamos a máxima variação de cada HRF como parâmetro, obtivemos resultados semelhantes. Nota-se que, embora em ambos os casos a resposta vascular aumenta, a taxa de variação é diferente para [HbO] e [HbR], sendo menor para esta última. Este resultado indica que curvas de HbO são mais sensíveis às variações paramétricas, e portanto melhores indicadores do comportamento da HRF em função do estímulo aplicado. Quanto à linearidade da resposta em função da duração do estímulo, alguns trabalhos na literatura sugerem que os efeitos de não-linearidade ocorrem somente para perturbações distantes do estado basal (Franceschini *et al.* 2008, Huppert *et al.* submitted), o que não é o presente caso. É provável que uma extrapolação das curvas acima para durações

maiores pudesse levar a uma saturação de $\Delta[HbO]$, porém este efeito não foi verificado.

Estudos recentes de Devor e colaboradores sugerem que a dilatação e a contração da resposta hemodinâmica refletem aspectos diferentes da ativação cerebral (Devor *et al.* 2005, Devor *et al.* 2007). O aumento de $[HbO]$, em relação ao estado basal, estaria relacionado com o estágio de despolarização neuronal, enquanto a diminuição refletiria o estágio de hiperpolarização. Na tentativa de buscar diferenças nestes dois estágios, separamos as contribuições das áreas positiva e negativa para a resposta de $[HbO]$, e verificamos a variação de cada um destes componentes (painel de baixo da Figura 3.6(b)). De fato, é possível notar comportamentos diferentes: enquanto a área positiva aumenta com a duração do estímulo, a área negativa permanece relativamente constante. Embora não seja possível relacionar tais divergências com parâmetros fisiológicos neste caso, de fato há diferenças nos aspectos vasculares, provavelmente induzidas pela atividade celular.

Nos dois experimentos citados neste capítulo, é possível notar que a oxigenação não só depende do tipo de estímulo aplicado e da região ativada, mas que esta dependência não necessariamente é linear, ao menos em relação à duração da atividade. O entendimento destas diferenças na resposta hemodinâmica é importante para um melhor conhecimento do comportamento neurofisiológico durante a ativação cerebral. No entanto, isto é apenas parte desta complexa relação; a outra parte, relacionada com esta, e que também carece de maiores explicações, diz respeito à relação entre o sistema vascular e o sistema neuronal, isto é, como o sistema vascular varia, em função do sistema neuronal. Este é o tema do próximo capítulo.

Capítulo 4

Modelagem do acoplamento neuro-vascular-metabólico durante ativação funcional

A existência de um acoplamento entre uma determinada atividade neuronal, fluxo sanguíneo e oxigenação é relativamente bem conhecida (Roy and Sherrington 1890). A explicação aceita para tal é a liberação sináptica associada com a comunicação neuronal, que inicia uma cadeia de processos e resultam em variações na vasculatura e na concentração de hemoglobina. A natureza deste acoplamento, conhecido como neuro-metabólico-vascular, contudo, é um assunto pouco entendido e de grande debate nos dias de hoje (Buxton *et al.* 2004, Riera *et al.* 2008).

No nível bioquímico, as relações neuro-vascular e neuro-metabólica têm sido intensamente estudadas (Aubert *et al.* 2001, Aubert and Costalat 2002). Contudo, a conexão dos resultados microscópicos para uma escala humana ainda é de difícil interpretação. Em relação às funções metabólicas e vasculares do cérebro, a introdução de descrições biofísicas, como os modelos do balão (Buxton *et al.* 1998) e de Windkessel (Mandeville *et al.* 1999), e seus posteriores avanços para a inclusão do transporte de oxigênio dos com-

partimentos vasculares para o tecido celular (Zheng *et al.* 2002, Zheng *et al.* 2005, Vazquez *et al.* 2006, Huppert *et al.* 2007b) têm fornecido informações importantes, capazes de explicar a inter-relação entre CBF, CBV e oxigenação - e, conseqüentemente, a origem de sinais hemodinâmicos provenientes de fMRI e DOI - durante uma ativação funcional.

No entanto, a conexão destes modelos vasculares e de transporte de oxigênio com uma suposta atividade neuronal é bem mais complexa. Embora alguns estudos se baseiam num modelo de acoplamento linear, onde a resposta hemodinâmica é proporcional à atividade neuronal, outros trabalhos têm indicado um acoplamento mais complicado e não linear. Assim, procuramos também entender e propor novas metodologias para compreender melhor a relação entre uma atividade neuronal e suas respostas metabólica e vascular. Os resultados obtidos encontram-se neste capítulo, iniciado com uma breve descrição dos principais modelos disponíveis na literatura, e complementado com metodologias inéditas, propostas neste trabalho, e que também resultaram nas seguintes publicações:

- Mesquita R.C. *et al.* (2008), *Investigating neurovascular coupling in rat brain with optical imaging and physiological modeling*, In: *OSA Biomedical Optics* (St. Petersburg, FL, USA)
- Mesquita R.C. *et al.* (2009), *Exploring neuro-vascular and neuro-metabolic coupling in rat somatosensory cortex*, *Phys. Med. Biol.* **54**, 175-185.
- Mesquita R.C. *et al.* (in prep), *Dependence of neurovascular coupling on frequency and duration variations during rats forepaw stimulation*

4.1 Modelos utilizados para simular ativação funcional

4.1.1 Modelos vasculares

O modelo do balão

Um dos principais modelos vasculares disponíveis na literatura atual é o modelo do balão (Balloon model, Buxton *et al.* 1998), um modelo de entrada-estado-saída governado por duas variáveis de estado. Sua idéia central é visualizar o compartimento venoso como um balão distensível, cuja entrada de fluxo (F_{in}) é dada pelo CBF, enquanto o fluxo de saída (F_{out}) é dado em função do volume do balão. A conservação de massa do sistema implica:

$$\frac{dV(t)}{dt} = F_{in}(t) - F_{out}(V, t) \quad (4.1)$$

onde V é volume do balão, uma das variáveis dinâmicas do sistema. O fluxo de saída deve descrever a capacidade das vênulas de expelir sangue numa taxa maior quando distendidas, e que inicialmente pode resistir a uma variação no volume:

$$f_{out}(v, t) = v(t)^{1/\alpha} + \tau_0 \frac{dv(t)}{dt} \quad (4.2)$$

onde α representa o expoente de Grubb (Seção 1.2.2), e τ_0 é uma constante de tempo que controla a duração do período transiente. As grandezas em minúsculo representam valores absolutos divididos pelo valor correspondente no estado basal (utilizaremos esta nomenclatura durante todo o restante deste trabalho).

A segunda variável dinâmica do sistema é a quantidade de HbR total presente no balão (q), cuja variação deve-se ao desequilíbrio da entrega de HbR ao compartimento venoso e da saída de HbR do mesmo:

$$\frac{dq(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} \left[f_{in}(t) \frac{E(t)}{E_0} - f_{out}(v, t) \frac{q(t)}{v(t)} \right] \quad (4.3)$$

onde $E(t)$ é a fração de oxigênio extraída do fluxo sanguíneo que chega ao balão, e E_0 é o seu valor no estado basal. Como esta quantidade depende da entrega de oxigênio ao

tecido, é conseqüentemente proporcional ao fluxo. Uma aproximação razoável para esta relação é (Buxton and Frank 1997)

$$E(t) = 1 - (1 - E_0)^{1/f_{in}(t)} \quad (4.4)$$

Assim, é possível notar que o modelo do balão é bastante simples, cuja dinâmica pode ser completamente descrita através de 4 parâmetros (E_0 , τ , α e τ_0), sendo necessária apenas uma única variável de estado como entrada no sistema (CBF). Suas hipóteses são bastante razoáveis no ambiente de fMRI, para onde foi inicialmente proposto e tem sido amplamente utilizado, com o propósito de explicar as bases fisiológicas do sinal BOLD. Como será abordado no Capítulo 5, acredita-se que este tipo de sinal vem da variação da concentração de HbR, encontrada majoritariamente nos compartimentos venosos. Desta forma, não há uma preocupação em considerar os compartimentos arteriais e capilares, bastante importantes na análise de sinais ópticos, como será visto no Capítulo 6.

O modelo de Windkessel

A formulação de Windkessel (WKM) para a vasculatura cerebral (Mandeville *et al.* 1999) é similar ao modelo do balão, mas fornece um mecanismo biomecânico para descrever a fisiologia do potencial evocado. A idéia é modelar a complacência capilar e venosa como uma resposta à variação de pressão produzida pela dilatação e/ou contração na arteríola. Para tal, usa-se o equivalente mecânico de um circuito elétrico, onde:

$$\begin{aligned} \text{carga } (q) &\longrightarrow \text{volume } (V) \\ \text{corrente } (i) &\longrightarrow \text{fluxo } (F) \\ \text{potencial } (V) &\longrightarrow \text{pressão } (P) \end{aligned}$$

Desta forma, um resistor e um capacitor em paralelo também produzem conservação de massa no sistema, com constante de tempo $\tau = RC$ (Figura 4.1(a)). Inicialmente, o fluxo (corrente) do sistema vem das arteríolas; uma variação na resistência destes vasos

(R_A) induz variações de pressão ao longo do circuito, culminando em variações passivas na resistência (R_W) e capacitância (C_W) de Windkessel. Parametrizando o espaço de fase do mapa pressão-volume, Mandeville *et al.* mostraram que esta relação pode ser descrita como uma lei de potência

$$V = AP_W^{1/\beta} \quad (4.5)$$

onde A é uma constante e $\beta > 1$ modela uma diminuição do volume quando os valores de pressão são altos. Este último parâmetro é conhecido como reserva de Windkessel. Através deste modelo, a relação entre o volume e o fluxo no estado estacionário ($t \rightarrow \infty$) é dada por

$$f = v^{\gamma+\beta} \quad (4.6)$$

onde $\gamma = 2$ representa fluxo laminar. Desta forma, o coeficiente de Grubb pode ser interpretado pela contribuição de dois termos diferentes, $1/\alpha = \gamma + \beta$. Baseado nas hipóteses acima, a solução do problema é simplesmente dado pela resolução das equações produzidas pelas leis de Kirchhoff, tendo como parâmetro inicial a dependência temporal de R_A .

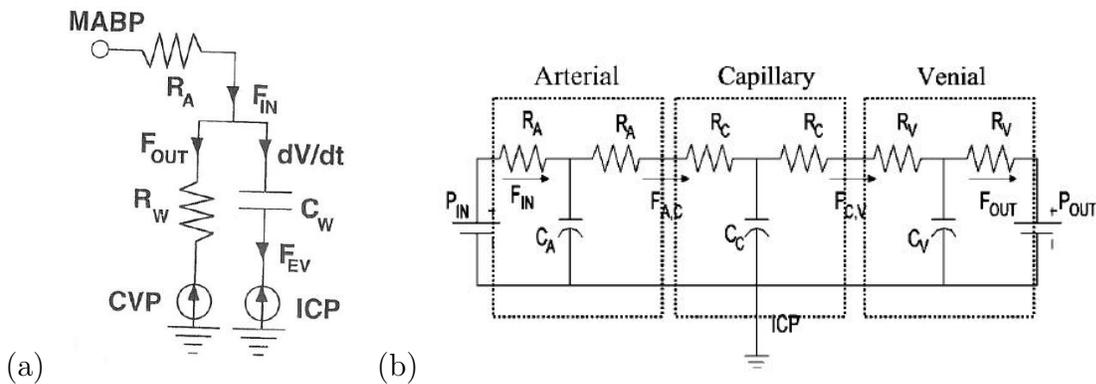


Figura 4.1: Representação esquemática (a) do modelo de Windkessel original e (b) da descrição multicompartimental proposta por Huppert *et al.* (2007b).

Uma extensão deste modelo foi proposta em 2007, quando Huppert *et al.* (2007b) apresentaram uma descrição multicompartimental das variações vasculares, separando as

diferentes contribuições das arteríolas, capilares e vênulas (Figura 4.1(b)). Usando a dilatação arterial $D_A(t)$ como parâmetro de entrada (uma grandeza física real do sistema), é possível usar a lei de Poiseuille para determinar a variação da resistência neste compartimento:

$$R_A(t) = \frac{128\eta}{\pi} \frac{l_A}{D_A(t)^4} \quad (4.7)$$

onde l_A e η representam o comprimento do vaso e a viscosidade do sangue, respectivamente. O fluxo, o volume, a pressão, a resistência e a capacitância em cada compartimento são calculados através das equações 4.1, 4.5, e do análogo da lei de Ohm para cada malha do circuito:

$$P_n(t) - P_{n+1}(t) = F_{n,n+1}(t) [R_n(t) + R_{n+1}(t)] \quad (4.8)$$

onde $n \in \{\text{arterial, capilar, venoso}\}$.

4.1.2 Modelos metabólicos

Além dos efeitos vasculares, as variações na atividade neuronal provocam um aumento local das funções metabólicas, como o da extração de oxigênio da rede vascular, que compete com o aumento de fluxo sangüíneo e resulta numa diminuição da fração de extração de oxigênio por parte do tecido. Alguns modelos tentam descrever este processo de extração de oxigênio dos compartimentos vasculares (Zheng *et al.* 2002, Zheng *et al.* 2005, Vazquez *et al.* 2006).

Huppert *et al.* (2007b) introduziram um sistema que considera a dinâmica do transporte de oxigênio entre os compartimentos arterial, capilar e venoso, além do tecido extravascular. O modelo é baseado na difusão de oxigênio, devido ao gradiente de concentração entre os três compartimentos e o tecido, como o descrito por Herman *et al.* (2006). A extração de oxigênio é estimada pelas diferenças de concentração entre os diferentes vasos e o tecido extravascular, e pode ser descrita por equações diferenciais:

$$\frac{\partial c_n O_2(t)}{\partial t} = -k_n [c_n O_2(t) - c_t O_2(t)] \quad (4.9)$$

onde os sub-índices $n \in \{\text{arterial, capilar, venoso}\}$ e t referem-se ao tecido. Na equação acima, k_n representa a constante de difusão e $c_j O_2(t)$ é a concentração de oxigênio, que nos vasos é dada pela soma da quantidade de oxigênio ligado à molécula de hemoglobina e do oxigênio dissolvido no plasma sanguíneo (Habler and Messmer 1997):

$$c_n O_2(t) = \alpha_p \cdot p_n O_2(t) + H_n \cdot HGB \cdot S_n O_2(t) \quad (4.10)$$

onde p_n e $S_n O_2$ representam a pressão e a saturação de O_2 , respectivamente. Nesta equação, o número de Hüfner, $H_n = 1,39 \text{ ml } O_2/\text{g Hb}$, é a quantidade de oxigênio ligado por grama de hemoglobina; a quantidade de hemoglobina no sangue é assumida como $HGB = 16 \text{ g Hb/dl}$ de sangue; α_p representa a solubilidade de oxigênio no plasma, e vale $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ ml } O_2/\text{mmHg dl}$ (Huppert *et al.* 2007b). No caso do tecido extravascular, a concentração de O_2 depende apenas da pressão parcial de oxigênio, e a solubilidade vale $\alpha_t = 1,18 \cdot 10^{-2} \text{ ml } O_2/\text{mmHg dl}$ (Habler and Messmer 1997).

No tecido extravascular, a variação da concentração de O_2 é dada pela diferença entre o oxigênio entregue ao tecido e aquele consumido, ou seja,

$$\frac{\partial c_t O_2(t)}{\partial t} = \sum_n k_n [c_n O_2(t) - c_t O_2(t)] - CMRO_2(t) \quad (4.11)$$

As equações 4.9 e 4.11 fornecem a solução para o transporte de O_2 no cérebro. Assumindo a saturação de O_2 no estado inicial e $CMRO_2(0)$ conhecidos, é possível determinar as constantes de difusão, e com estas, a dinâmica para as concentrações de oxigênio em cada compartimento. A saturação e pressão parcial de O_2 podem ser recuperadas pela inversão não-linear da equação 4.10, uma vez que estas grandezas podem ser relacionadas pela equação de Kelman (Severinghaus 1979). A concentração total de HbO e HbR pode ser estimada a partir destes valores, e em seguida comparada diretamente com os resultados obtidos por NIRS.

4.1.3 Conexões com atividade neuronal

A conexão de modelos vasculares e de transporte de oxigênio com a atividade neuronal é um pouco mais complexa, principalmente devido à falta de informações neuronais que podem ser diretamente correlacionadas com a atividade e utilizadas para comparações com a hemodinâmica. Numa das primeiras tentativas, Friston *et al.* (2000) partiram da hipótese de que o sistema que conecta a atividade sináptica e CBF é linear, escolhendo uma relação do tipo

$$\frac{df_{in}(t)}{dt} = s(t) \quad (4.12)$$

onde a atividade sináptica $s(t)$ é gerada a partir da atividade neuronal $u(t)$:

$$\frac{ds(t)}{dt} = \epsilon u(t) - \frac{s(t)}{\tau_s} - \frac{f_{in}(t) - 1}{\tau_f} \quad (4.13)$$

e ϵ representa a eficiência da produção de atividade sináptica a partir da atividade neuronal; τ_s e τ_f são constantes de tempo, de forma a ajustar a resposta hemodinâmica de CBF, única grandeza física mensurável. Com estas duas equações, Friston e colaboradores conectaram uma suposta atividade neuronal ao modelo do balão, e estimaram os parâmetros iniciais a partir de dados coletados em fMRI. Contudo, estas relações ainda não fornecem informações para a compreensão das relações neuro-vasculares e neuro-metabólicas.

Riera *et al.* (2005) também partiram de uma abordagem “bottom-up” para estimar parâmetros de dados combinados de EEG e fMRI em humanos, sendo capazes de relacionar sinais neuronais e vasculares. Além de extremamente complexo, este modelo usa dados das duas técnicas citadas para ajustar parâmetros e estados dentro do sistema, cujas hipóteses acerca da relação neuro-vascular foram consideradas lineares e que, embora biologicamente plausíveis, não foram testadas.

Várias outras tentativas de relacionar a atividade neuronal com dados hemodinâmicos estão disponíveis na literatura (Buxton *et al.* 2004, Sotero and Trujillo-Barreto 2007). Em muitas destas, as relações neuro-metabólicas são esquecidas, ou conectadas através

das relações vasculares, e a base para um acoplamento neuro-vascular é assumida como linear, embora nenhum fato experimental corrobore esta hipótese. Uma das propostas deste trabalho foi justamente investigar a plausibilidade de uma função resposta linear capaz de relacionar as variações neuronais, metabólicas e vasculares.

4.2 Abordagem via função resposta

Alguns estudos sugerem que a relação entre o estímulo inicial e a resposta vascular pode ser representada por uma série de transformações (Nangini *et al.* 2006, Franceschini *et al.* 2008):

$$\text{estímulo (s)} \longrightarrow \text{atividade neuronal (n)} \longrightarrow \text{resposta vascular (r)}$$

onde $s \rightarrow n$, $n \rightarrow r$ e $s \rightarrow r$ são geralmente assumidas como lineares e invariantes no tempo (LTI). Estas duas características implicam no fato de que o sistema que realiza a transformação pode ser completamente caracterizado por uma função de transferência, ou função resposta. Assim, dada uma informação neuronal como entrada, pode-se prever as correspondentes variações vasculares através da função de transferência do sistema.

Baseado neste fato, desenvolvemos uma metodologia para estimar as funções de transferência para os acoplamentos neuro-vascular e neuro-metabólico a partir de medidas eletrofisiológicas e hemodinâmicas simultâneas. Este modelo, que é uma extensão do modelo de Windkessel multicompartimental proposto por Huppert *et al.* (2007b), é baseado numa rotina de otimização não-linear para estimar os parâmetros intrínsecos e prever a saída do sistema. Considerando medidas eletrofisiológicas, ao invés de simplesmente fornecer detalhes do desenho de estimulação, estamos de fato fornecendo uma base neuronal para as respostas metabólicas e vasculares à atividade funcional, e ao mesmo tempo reduzindo o grau de liberdade do sistema ao analisar dados paramétricos. Abaixo descrevemos o modelo proposto e sua aplicação a um experimento paramétrico de estimulação do córtex somatosensorial em ratos, além de discutir o significado fisiológico das funções

de transferência neuro-metabólica e neuro-vascular estimadas.

4.2.1 Construção do modelo direto

Definimos dois sistemas, um neuro-metabólico e outro neuro-vascular, assumindo a hipótese de linearidade já mencionada, também implícita nos modelos de Friston *et al.* (2000) e Riera *et al.* (2005). Desta forma, a convolução de uma informação neuronal com a função de transferência adequada se constitui num modelo capaz de fornecer variações referentes aos processos metabólicos e/ou vasculares. Mais especificamente, se medirmos sinais diretamente relacionados com a atividade neuronal ($\Delta N(t)$), podemos utilizar estes dados para guiar as variações vasculares e metabólicas, como a dilatação nas arteríolas ($D_A(t)$) e a taxa metabólica de consumo de oxigênio ($CMRO_2(t)$), através de uma simples convolução com a respectiva função de transferência $f(t)$ do sistema:

$$\Delta D_A(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \Delta N(\tau) \cdot f_{D_A}(t - \tau) \cdot d\tau \quad (4.14)$$

$$\Delta CMRO_2(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \Delta N(\tau) \cdot f_{O_2}(t - \tau) \cdot d\tau \quad (4.15)$$

As funções de transferência de ambos os sistemas foram assumidas como uma variante da função Gamma:

$$f(t) = \Theta(t - \tau_0) \frac{(t - \tau_0)^2 \Delta f}{\kappa} \exp\left(\frac{-(t - \tau_0)^2}{\sigma^2}\right) \quad (4.16)$$

onde a função $\Theta(t)$ representa a função de Heaviside, e τ_0 e σ são o tempo de início (atraso) e a largura da função resposta, respectivamente; Δf representa a variação da amplitude, e κ é uma constante de normalização arbitrária.

O produto da convolução das equações 4.14 e 4.15 constitui o vetor de entrada do modelo vascular e de transporte de oxigênio descrito por Huppert *et al.* (2007b) (equações 4.7 e 4.11). Assim, com as informações provenientes das equações 4.14 e 4.15, pode-se inferir CBF, CBV e saturação de HbO e HbR em cada compartimento vascular, e com isso modelar respostas hemodinâmicas vinculadas às medidas neuronais diretas, coletadas

em experimentos. Através de um modelo que possa prever observações adquiridas por diferentes técnicas, como fMRI, NIRS e PET, é possível reproduzir os resultados obtidos por uma ou mais destas metodologias. Nossa proposta constitui-se, portanto, numa ferramenta direta que relaciona informação neuronal com resultados hemodinâmicos, dividida em três partes:

1. a criação de estados dinâmicos metabólicos e vasculares a partir de sinais neuronais (equações 4.14 e 4.15);
2. a estimativa de parâmetros vasculares a partir do modelo de Windkessel modificado (equações 4.1, 4.5, 4.7 e 4.8);
3. a estimativa de parâmetros metabólicos a partir do modelo de transporte de oxigênio (equações 4.9 e 4.11).

4.2.2 O modelo inverso

O modelo apresentado na seção anterior pode ser colocado no formalismo de espaço de estados para descrever as respostas de CBF, CBV e de oxigenação. O vetor de estado é constituído por um conjunto de 14 parâmetros independentes que definem as propriedades estruturais e funcionais do sistema. Entre as propriedades estruturais, assumidas constantes para diferentes condições de estímulos, estão as constantes fisiológicas e os parâmetros intrínsecos do modelo de Windkessel. As propriedades funcionais representam as funções de transferência do sistema neuronal para os sistemas metabólico e hemodinâmico.

A partir do vetor de estado inicial, estima-se CBF e as respostas de hemoglobina pelo método descrito no modelo direto. Estas estimativas são comparadas com as observações experimentais, e um processo de otimização não-linear busca minimizar uma função custo, de forma a encontrar os parâmetros que melhor descrevem os resultados experimentais.

Escolhemos uma função custo ponderada por quadrados mínimos, de forma que o problema a ser resolvido é dado por

$$\text{Min } f(\mathbf{x}) = \sum_i \sum_{t=1}^N \frac{\left(Y_{meas}^{(i,t)} - Y_{pred}^{(i,t)}\right)^2}{R_{i,t}} \quad (4.17)$$

onde $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^{14}$ é o vetor de estado, i é a variável sobre todos os observáveis medidos, t é a variável temporal, e $Y_{meas}^{(i,t)}$ e $Y_{pred}^{(i,t)}$ representam os valores do observável medido e do estimado pela saída do modelo direto, respectivamente. A função escolhida ainda é ponderada pela variância $R_{i,t}$ das medidas experimentais, de forma que pontos com variâncias maiores têm menor peso no cálculo dos resíduos.

De forma a limitar o vetor de estados para soluções fisiologicamente plausíveis, limites inferior e superior de cada parâmetro a ser estimado foram incluídos como equações de vínculo no processo de minimização. A Figura 4.2 resume todo o modelo bottom-up utilizado para a solução do problema, enquanto os detalhes computacionais utilizados na criação do algoritmo podem ser encontrados no Apêndice B.

A adição da informação neuronal no modelo força os parâmetros relacionados com as propriedades funcionais a serem constantes, independentes do tipo de estímulo. Este fato provoca uma redução do número de parâmetros, quando analisamos experimentos paramétricos simultaneamente. Esta é uma característica única do modelo, fornecendo a solução de um número muito grande de condições experimentais com apenas 14 parâmetros. Para a análise de 9 condições paramétricas diferentes, como veremos a seguir, o número mínimo de parâmetros a serem estimados pelo modelo descrito em Huppert *et al.* (2007) seria 59, significativamente maior do que o que estamos usando.

4.2.3 Validação do modelo através da variação da amplitude

Para validar o modelo desenvolvido nas seções anteriores, utilizamos dados experimentais previamente publicados em Huppert *et al.* (2007), e que não foram medidos diretamente neste trabalho.

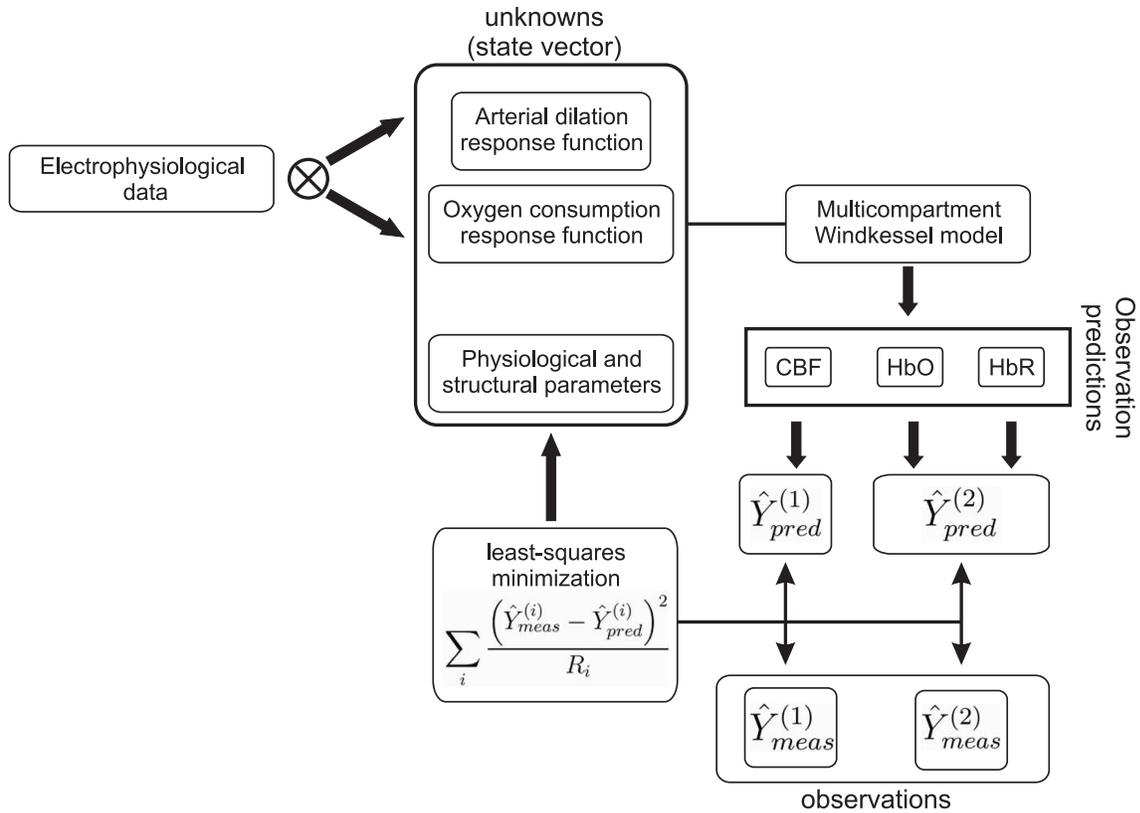


Figura 4.2: Representação esquemática da abordagem proposta.

Protocolo experimental

Foram usados 7 ratos Sprague-Dawley, machos, com peso entre 250 e 350 g cada, que foram anestesiados com 2% de halotano e preparados para craniotomia, onde a parte do crânio localizada sobre o córtex somatossensorial foi removida. Depois da cirurgia, o anestésico ministrado passou a ser 50 mg/kg de α -clorase, seguido de infusão contínua a 40 mg/kg/h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Subcomitê de Pesquisa Animal do MGH, onde os experimentos foram realizados.

O protocolo de estimulação consistiu na deflexão de um único fio de cabelo do bigode do rato, controlado via computador durante 2 s, a uma taxa de repetição de 8 Hz, e com deflexão variável entre 240 μm e 1200 μm , dividida em 9 condições diferentes com incrementos iguais em amplitude (Devor *et al.* 2003). Os estímulos foram aplicados de

forma aleatória e usando um paradigma casual, ao longo de 6 minutos, com ISI médio de 12 s. A série foi repetida pelo menos 5 vezes em cada animal.

Sobre o córtex somatosensorial foram colocados microeletrodos de metal (FHC, Bowdoinham, ME, EUA), com 5-7 $M\Omega$ de impedância, para adquirir dados eletrofisiológicos. Estes dados foram amplificados eletronicamente, e filtrados para a aquisição de dois tipos de sinal: um com baixa frequência, entre 0,1 e 500 Hz, conhecido na literatura como potencial de campo local (LFP); e outro usando um filtro passa-alta (150 - 5000 Hz), para fornecer a atividade múltipla dos neurônios (MUA) (Ulbert *et al.* 2001). Estes dois tipos de sinal evidenciam processos diferentes do sistema neuronal. MUA está mais diretamente relacionado com a atividade sináptica, enquanto LFP reflete uma soma ponderada das correntes entre as membranas devido às atividades sinápticas e dendríticas (Devor *et al.* 2003), variando de acordo com a profundidade do eletrodo. A Figura 4.3 mostra os dois parâmetros fisiológicos para três condições de deflexão, obtidos através da média entre todos os indivíduos.

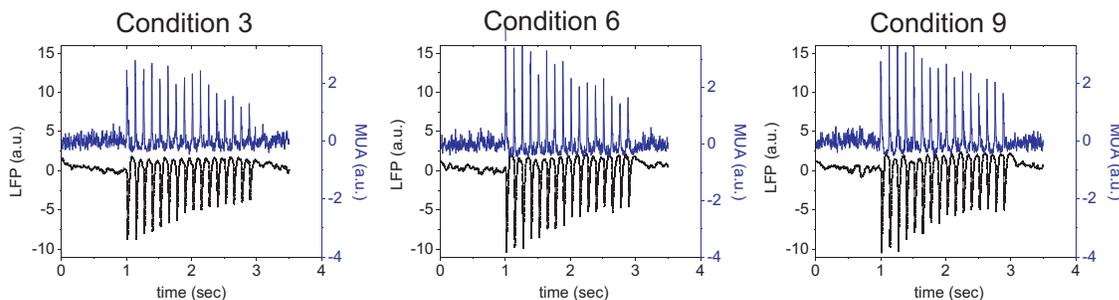


Figura 4.3: Média de LFP e MUA, obtida através da média de 7 ratos na região de interesse, para 3 das 9 condições de estimulação usadas. A deflexão ocorreu entre 1 e 3 s.

Para uma análise quantitativa, os dados de MUA foram suavizados ao longo do tempo usando um filtro Gaussiano de 1 ms de largura, com e^{-1} de amplitude. Ambos os sinais de LFP e MUA foram normalizados em relação à amplitude de pico da 9^a condição (maior deflexão) antes da média do grupo ser tomada. Como parâmetro neuronal, analisamos a influência da amplitude de cada pico e, alternativamente, também tomamos a área sob

cada um dos 16 pulsos provenientes do trem de estímulos. Desta forma, trabalhamos com 4 combinações de informação neuronal possíveis para usar na estimação dos parâmetros (MUA_{pico} , MUA_{area} , LFP_{pico} e LFP_{area}).

A obtenção de dados referentes à oxigenação do tecido foi obtida a partir de imagens espectroscópicas com vários comprimentos de onda (Devor *et al.* 2003). O córtex foi iluminado por uma lâmpada de arco de xenônio-mercúrio com filtros passa-banda centrados em 6 comprimentos de onda diferentes (560, 570, 580, 590, 600 e 610 nm). As imagens foram adquiridas com uma câmara CCD resfriada (12 bits, taxa de aquisição a 18 Hz). As variações de [HbO] e [HbR] foram calculadas a partir da lei de Beer-Lambert modificada, descrita no Capítulo 2. O fluxo sanguíneo na região também foi medido a partir de contraste obtido por laser speckle (Dunn *et al.* 2001), onde imagens de CBF podem ser determinadas calculando as variações no contraste produzido por um laser de prova numa série de imagens obtidas por CCD (Dunn *et al.* 2005).

Os resultados de laser speckle e de espectroscopia foram deconvoluídos usando a série temporal da apresentação de estímulos para determinar as respostas funcionais de CBF e hemoglobina, respectivamente. Definimos regiões de interesse manualmente, selecionando a região do córtex correspondente à estimulação do bigode. A média do grupo de 7 animais foi calculada, e normalizada em relação à amplitude da última condição.

Resultados e discussão

A Figura 4.4 mostra os dados hemodinâmicos obtidos experimentalmente (pontos) e a curva prevista pelo modelo via função de transferência com o vetor de estado otimizado, para as condições 3, 6 e 9, quando MUA_{area} foi utilizado como informação neuronal para a convolução com a função de transferência a ser otimizada. Curvas similares também foram encontradas quando usamos as outras três combinações de dados neuronais como entrada.

O vetor de estado estimado ficou dentro de regiões reportadas na literatura (Mandeville

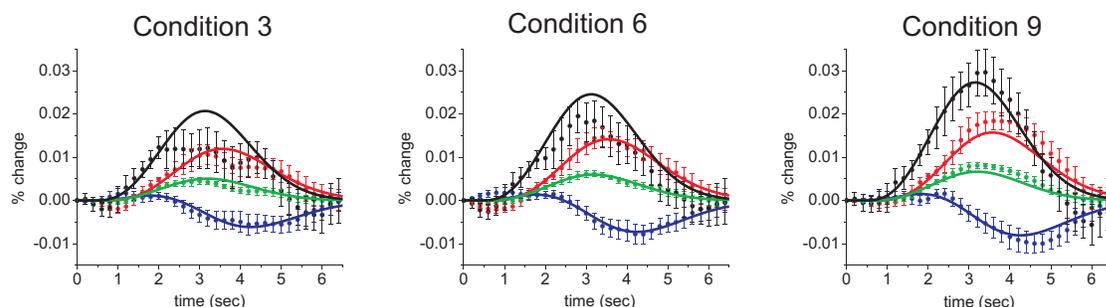


Figura 4.4: Respostas hemodinâmicas medidas por DOI e laser speckle para as amplitudes 3, 6 e 9 de deflexão do bigode do rato. Medidas de CBF, HbO, HbR e HbT são mostradas como pontos preto, vermelho, azul e verde, respectivamente. As barras de erro representam o desvio padrão entre as diferentes tentativas. As curvas sólidas são os estados estimados para as grandezas acima. O início do estímulo é considerado em $t = 0$.

et al. 1999, Boas *et al.* 2003, Zheng *et al.* 2005, Herman *et al.* 2006) em todos os casos analisados, e muito próximo dos parâmetros obtidos por Huppert *et al.* (2007) para as mesmas medidas hemodinâmicas. Os parâmetros estruturais não variaram significativamente, independente do dado neuronal utilizado como entrada. A reserva de Windkessel, por exemplo, foi estimada entre $2,4 \leq \beta \leq 2,8$, enquanto o tempo de trânsito vascular se manteve em $0,72 \leq \tau \leq 0,74$ s. Ambos os parâmetros estão de acordo com estudos anteriores relacionados com ativação funcional (Mandeville *et al.* 1999, Zheng *et al.* 2005).

Para testar a confiabilidade dos parâmetros obtidos e estimar a variância dos mesmos, realizamos uma amostragem no espaço de estados via simulação por cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC, Apêndice B). A idéia do algoritmo é determinar a densidade de probabilidade do vetor de estado otimizado a partir de uma amostragem inicial aleatória (Carter and Kohn 1996). Com isso, determinamos os intervalos de confiança ao nível de 95% de confiabilidade para cada parâmetro. A tabela 4.1 mostra todos os parâmetros utilizados, com seus respectivos valores estimados para o caso em que MUA_{area} foi utilizado como informação neuronal.

Para medir a correlação entre os valores medidos e as respostas estimadas, calculamos

Tabela 4.1: Todos os 14 parâmetros usados para modelar os dados experimentais e seus limites fisiológicos considerados. As duas últimas colunas representam a solução ótima do problema de inverso e os limites de confiabilidade estimados por simulação MCMC.

Descrição	Símbolo	Limite		Intervalo de confiança
		fisiológico	Estimativa	
<i>Função resposta da dilatação arterial</i>				
Varição amplitude	Δf_A	(0 - 10) %	1.04 %	[1.03 - 1.26]
Tempo de atraso	$\tau_{0,A}$	(0 - 5) s	0.45 s	[0.43 - 0.55]
Largura da curva	σ_A	(0.7 - 3) s	1.83 s	[1.82 - 1.86]
<i>Função resposta do consumo de oxigênio</i>				
Varição amplitude	Δf_{O_2}	(0 - 10) %	0.70 %	[0.57 - 0.71]
Tempo de atraso	τ_{0,O_2}	(0 - 2) s	0.001 s	[0.00 - 0.15]
Largura da curva	σ_{O_2}	(0.7 - 3) s	0.84 s	[0.79 - 0.86]
<i>Variáveis estruturais</i>				
Resistência arterial inicial	$R_A(0)$	(0.2 - 0.9) a.u.	0.59 a.u.	[0.58 - 0.60]
Reserva vascular de Windkessel	β	(1 - 5) a.u.	2.43 a.u.	[2.35 - 2.46]
Tempo de trânsito	τ	(0.5 - 4) s	0.73 s	[0.70 - 0.76]
Tempo de trânsito pia-mater	τ_{pial}	(0 - 4) s	0.33 s	[0.21 - 0.58]
<i>Variáveis hemodinâmicas</i>				
Concentração hemoglobina total inicial	$[\text{HbT}](0)$	(40 - 140) $\mu\text{mol/l}$	86.5 $\mu\text{mol/l}$	[84.3 - 86.8]
Saturação oxigênio arterial inicial	$S_aO_2(0)$	(90 - 100) %	92.4 %	[90.0 - 92.8]
Saturação oxigênio capilar inicial	$S_cO_2(0)$	(60 - 90) %	71.3 %	[71.1 - 71.4]
Saturação oxigênio venoso inicial	$S_vO_2(0)$	(55 - 89) %	65.9 %	[65.8 - 66.2]

o valor de R^2 para cada estado, em cada condição, para todas as combinações possíveis de dados neuronais. Este parâmetro indica a fração da variância total considerada por todas as medidas. Os valores médios podem ser vistos na tabela 4.2, assim como a comparação destes com a correlação medida por Huppert *et al.* (2007). Embora tenha apresentado valores de R^2 ligeiramente menores que o trabalho citado, nosso modelo de otimização produz estimativas ainda estatisticamente significantes, com uma alta correlação entre o modelo e os dados experimentais. Além disso, usamos medidas eletrofisiológicas como vínculos no problema de otimização, diminuindo bastante os graus de liberdade do sistema (utilizamos 14, enquanto o trabalho citado utilizou 59). Os resultados são ainda mais expressivos quando realizamos testes F estatísticos, que levam em consideração o grau de liberdade na correlação e podem ser calculados a partir dos valores de R^2 . Em resumo, nota-se que o modelo proposto, via função resposta, é significativamente melhor, produzindo correlação similar com 70% menos graus de liberdade.

As funções de transferência neuro-vascular e neuro-metabólica estimadas são apresentadas na Figura 4.5. Independentemente do dado de entrada (amplitude do pico ou área), a função resposta obtida para cada observação foi similar, embora tenha apresentado uma amplitude menor quando LFP foi usado. A função de transferência para o sistema vascular apresentou-se mais atrasada e com uma maior largura quando comparada à função de transferência para o sistema metabólico, que respondeu quase que instantaneamente e por um curto período de tempo. Este resultado indica que a resposta vascular, medida em nosso modelo através da dilatação arterial, é mais lenta do que a resposta metabólica, o que é razoável dada a natureza biomecânica do sistema neuro-vascular-metabólico. O modelo proposto mantém a causalidade esperada nas relações fisiológicas cerebrais.

A resposta fisiológica de cada sistema, representada pela variação de $CMRO_2$ e da dilatação arterial, pode ser calculada pela convolução direta dos dados eletrofisiológicos com a correspondente função de transferência estimada. A Figura 4.5 mostra estas variações para as condições 3, 6 e 9, usando LFP_{area} para guiar o processo de otimização. A razão

Tabela 4.2: Valores de R^2 e do teste F para as combinações utilizadas, comparadas com o estudo realizado por Huppert e colaboradores. As incertezas foram calculadas a partir do desvio padrão.

		Ajuste do modelo				
		MUA area	MUA pico	LFP area	LFP pico	Huppert <i>et al.</i> (2007)
HbO	R^2	0.94 ± 0.03	0.94 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.97 ± 0.03
	F	1063 ± 38	1063 ± 44	902 ± 38	902 ± 37	523 ± 16
HbR	R^2	0.93 ± 0.04	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.96 ± 0.06
	F	902 ± 34	781 ± 34	781 ± 36	781 ± 38	389 ± 23
HbT	R^2	0.92 ± 0.05	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.06	0.91 ± 0.06	0.96 ± 0.04
	F	781 ± 44	781 ± 51	687 ± 46	687 ± 45	389 ± 16
CBF	R^2	0.83 ± 0.10	0.82 ± 0.11	0.82 ± 0.11	0.82 ± 0.11	0.92 ± 0.08
	F	332 ± 41	310 ± 40	310 ± 42	310 ± 40	187 ± 17
Total	R^2	0.90 ± 0.05	0.90 ± 0.06	0.89 ± 0.06	0.90 ± 0.06	0.95 ± 0.05
	F	611 ± 38	611 ± 42	550 ± 39	611 ± 43	308 ± 17

$\Delta CBF/\Delta CMRO_2$ média encontrada para todas as condições de estimulação foi de $(3, 3 \pm 0, 8)$, que é consistente com valores previamente reportados (Kastrup *et al.* 2002, Hoge *et al.* 2005).

Todos os resultados acima mostram a viabilidade de usar medidas eletrofisiológicas e hemodinâmicas conjugadas para a obtenção de parâmetros estruturais, fisiológicos e relacionados com o acoplamento neuro-vascular-metabólico. A fim de mostrar a generalidade da ferramenta proposta, testamos algumas variações das opções feitas para o desenvolvimento original do modelo.

Em relação à forma da função de transferência, assumiu-se inicialmente uma variante da função Gamma, descrita pela equação 4.16. Esta curva tem sido usada em trabalhos anteriores (Buxton *et al.* 2004, Huppert *et al.* 2007b) para modelar a resposta hemodinâmica.

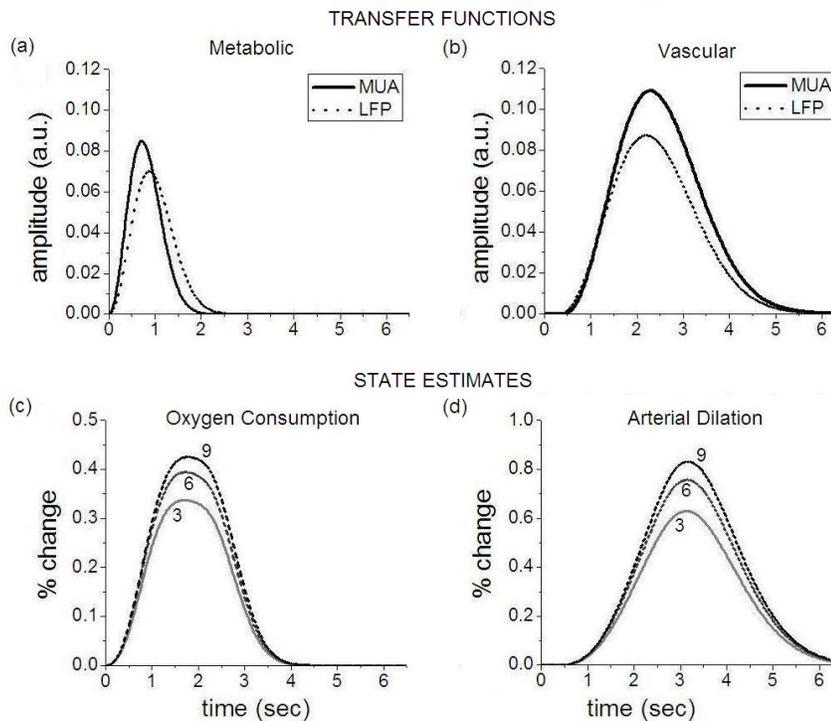


Figura 4.5: Função de transferência estimada para os sistemas (a) neuro-metabólico e (b) neuro-vascular, que representa a resposta devido a um único pulso de estímulo. As curvas sólidas (tracejadas) foram obtidas usando a área dos dados de MUA (LFP). No painel de baixo, a convolução das funções de transferência com os dados eletrofisiológicos (LFP_{area}), resultando nas estimativas de variações paramétricas de (c) $CMRO_2$ e (d) dilatação arterial (condições 3, 6 e 9). Em ambos os gráficos, $t = 0$ representa o momento de início do estímulo.

Neste trabalho, esta variante mostrou-se também adequada. Além disso, a inclusão da função de Heaviside na equação permite controlar o início de atividade em cada um dos sistemas, consistindo num novo parâmetro que pode ser utilizado para caracterizar as diferentes formas de acoplamentos encontradas no cérebro durante uma ativação cerebral. No entanto, quando assumimos a função gaussiana como forma de modelar as funções de transferência, os resultados obtidos foram similares aos originais, descritos pela função Gamma.

Também analisamos a influência do vetor de estados inicial na determinação da solução

ótima do modelo inverso do problema, e verificamos que as estimativas finais não variaram significativamente. Quando variados entre $\pm 20\%$ os parâmetros que descrevem o vetor de estados, a solução ótima encontrada foi factível e caiu dentro dos limites de incerteza calculados por MCMC, independentemente da posição inicial.

Finalmente, porque as diferentes medidas eletrofisiológicas descrevem mecanismos diferentes relacionados com a atividade neuronal, é possível analisar a influência de uma ou outra quando usada como informação neuronal para o estudo do acoplamento neuro-vascular-metabólico. De fato, as estatísticas obtidas para MUA são ligeiramente melhores do que as encontradas para LFP em nossos resultados, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $\alpha < 0,05$). Talvez estas diferenças teriam sido mais visíveis com o emprego de diferentes paradigmas de estimulação que evocassem comportamentos mais divergentes entre MUA e LFP. Um ponto de particular interesse é o comportamento de vasoconstrição nas vizinhanças do foco de ativação observado durante estimulação na pata dianteira de ratos (Devor *et al.* 2007), que parece ser proveniente de uma alta hiperpolarização e suporta a hipótese, no mínimo intrigante, que a despolarização resulta na vasodilatação enquanto a hiperpolarização é responsável por uma vasoconstrição. A metodologia proposta nesse trabalho permite testar esta hipótese, separando as respostas de MUA e LFP em duas componentes para guiar dilatação e/ou constrição. Esta conjectura foi colocada à prova com o presente conjunto de dados experimentais, mas não achamos nenhuma evidência contra ou a favor desta hipótese.

4.3 Descrição bioquímica dos sistemas neuro-metabólico e neuro-vascular

A descrição via função de transferência introduzida na seção anterior permite caracterizar os sistemas neuro-metabólico e neuro-vascular durante a ativação funcional, e a partir desta caracterização entender o comportamento das variáveis neurofisiológicas sob

determinadas condições de estimulação. No entanto, não fornece uma explicação detalhada das relações e componentes envolvidos em cada sistema. Buscando uma resposta nesta direção, aplicamos um modelo preliminar que visa entender as relações bioquímicas durante o acoplamento. Este modelo foi desenvolvido junto ao grupo do laboratório de biofotônica do Instituto de Engenharia Biomédica da Universidade de Bogaziçi (Istambul, Turquia), e baseado em hipóteses e equações de transporte disponíveis na literatura (Aubert and Costalat 2002).

Sabe-se que o neurônio age como um conversor de corrente em frequência, de forma que um estímulo pode ser codificado por um espectro definido na frequência, e as equações de Hodgkin-Huxley descrevem tal comportamento (Hodgkin and Huxley 1952). Assim, para modelar os mecanismos bioquímicos que levam à vasodilatação, usamos o espectro de frequências dos dados de MUA como vetor de entrada nas equações de Hodgkin-Huxley, e a partir daí estimar variações na corrente de influxo de sódio através da membrana neuronal¹. Usamos as equações de Aubert para descrever a dinâmica de Na no neurônio, assim como todo o metabolismo energético (Aubert *et al.* 2001, Aubert and Costalat 2002). Os produtos desta via de sinalização metabólica levam à variação de vasodilatadores, como CO_2 , resultando num aumento de CBF local.

Paralelamente ao influxo de Na, o potencial de ação também resulta num influxo de Ca no neurônio, com o objetivo de facilitar o fluxo de neurotransmissores na região sináptica. Esta sinalização intracelular desencadeia a síntese de óxido nítrico (NO), que se propaga para fora da célula e produz um efeito inibitório sobre a liberação de Ca nas metaarteríolas (Shouval *et al.* 2002).

As variações nos vasos sangüíneos fazem o CBF depender diretamente dos efeitos de

¹Escolhemos utilizar dados de MUA, ao invés de LFP, porque este tipo de sinal está mais diretamente relacionado com a atividade sináptica, um parâmetro que melhor reflete as variações do potencial de membrana.

CO_2 e NO devido ao potencial de ação. Assumimos uma proporcionalidade tal que

$$CBF \propto 1 + \% \Delta NO + \% \Delta CO_2 \quad (4.18)$$

Resumindo, o modelo assume uma variação de CBF a partir das variações de NO e CO_2 , conseqüência do influxo de Ca e Na para o neurônio, respectivamente, devido ao potencial de ação. Toda esta dinâmica foi obtida através dos trabalhos de Aubert *et al.* (2002) e Shouval *et al.* (2002). Nossa contribuição foi vincular a entrada dos modelos anteriores com observáveis físicos, utilizando as equações de Hodgkin-Huxley para descrever o influxo de Na, e o espectro de frequência de MUA como parâmetro de entrada para as duas vias de sinalização. Desta forma, é possível explicar as relações entre ativação neuronal e resposta hemodinâmica do ponto de vista bioquímico.

Para testar nosso modelo e validar as hipóteses descritas acima, utilizamos os mesmos dados experimentais descritos na Seção 4.2.3, e publicados em Huppert *et al.* (2007). Ao contrário da abordagem via função resposta, as nove condições de deflexão foram ajustadas independentemente, a partir do espectro de frequência de MUA para cada condição. O aumento no diâmetro pré-capilar e no consumo de oxigênio previsto pelo modelo pode ser visto nas Figuras 4.6(b) e 4.6(d), respectivamente. Para comparação, as Figuras 4.6(a) e 4.6(c) mostram os resultados obtidos via função resposta. Qualitativamente, nota-se uma concordância na dinâmica temporal do mecanismo de vasodilatação, embora a constante de tempo para o retorno ao estado basal é maior no modelo bioquímico. Quantitativamente, não é possível comparar a amplitude dos dois modelos, uma vez que trata-se de vasos diferentes, embora próximos. Uma forma de calibração seria necessária nesse caso. A variação de consumo de O_2 se manteve na mesma faixa em ambos os modelos, e comparável a resultados obtidos anteriormente (Huppert *et al.* 2007b).

Podemos comparar a dependência dos parâmetros metabólicos e vasculares em função da amplitude de estimulação e dos dados eletrofisiológicos de MUA. A Figura 4.7 mostra o valor da área normalizada sob a curva estimada, para cada condição. Nota-se que, para os dois modelos independentes, à medida que a amplitude de estimulação aumenta, tanto

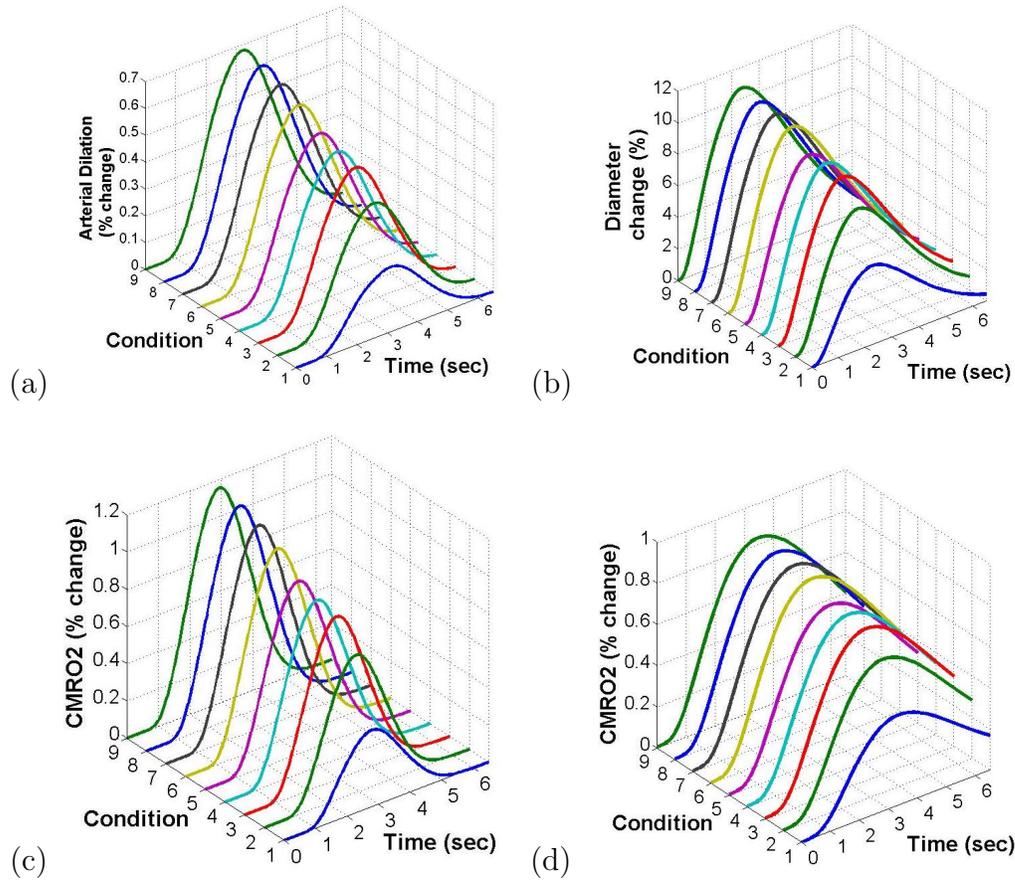


Figura 4.6: *Variação do diâmetro vascular e do consumo de O_2 estimados através dos modelos estudados. A primeira coluna foi obtida através da abordagem via função resposta, enquanto a segunda coluna foi estimada através do modelo bioquímico.*

a resposta hemodinâmica como a metabólica parece saturar. Quando visto em função da área sob os picos de MUA, o comportamento parece ser linear, o que implica que a resposta eletrofisiológica também atinge um ponto de saturação. Este resultado é claro para a abordagem via função resposta, uma vez que a operação de convolução é linear, mas as equações de Hodgkin-Huxley não compartilham de tal característica.

Estes resultados, obtidos por duas abordagens diferentes e independentes entre si, sugerem que a atividade neuronal de fato modula as respostas vascular e metabólica através da dilatação arterial e de $CMRO_2$. Em resumo, mostramos que é possível prever a

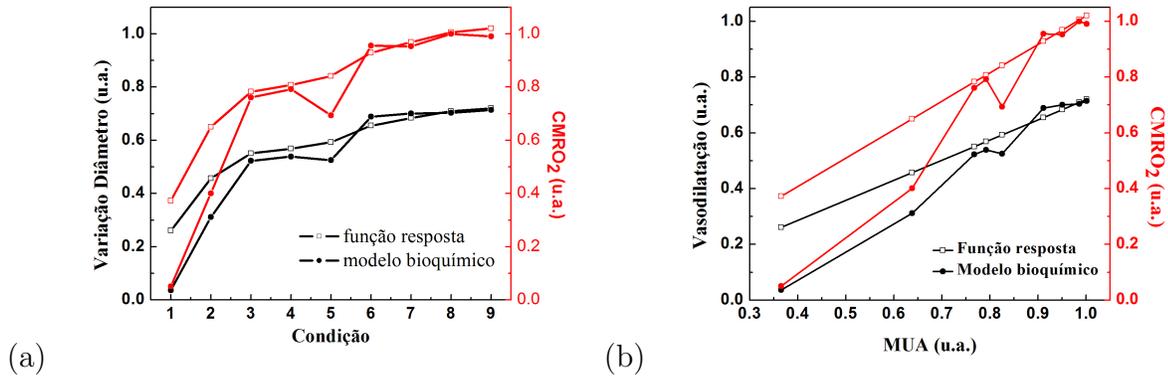


Figura 4.7: *Variação do diâmetro do vaso sanguíneo e de $CMRO_2$ em função (a) da amplitude do estímulo e (b) de MUA.*

hemodinâmica do potencial evocado diretamente de dados eletrofisiológicos. Estimamos a função de transferência para os sistemas neuro-metabólico e neuro-vascular usando o modelo de Windkessel multicompartimental. Também modelamos o acoplamento neurovascular a partir de uma perspectiva bioquímica. Em ambos os casos, obtivemos resultados coerentes entre si e com a literatura. Particularmente, a abordagem via função resposta disponibiliza um método experimental e poderoso de aplicação multimodal para clarificar o acoplamento neuro-vascular-metabólico. Por outro lado, o modelo bioquímico fornece uma visão das vias de sinalização entre a atividade neuronal e a resposta hemodinâmica.

Capítulo 5

Determinação do consumo de oxigênio durante ativação cerebral

A estimativa do consumo metabólico de oxigênio, com alta resolução espacial e temporal, tem sido alvo de investigação cada vez maior durante os últimos anos. A validação de um método confiável de para obtenção de imagens metabólicas como $CMRO_2$ é desejável, uma vez que poderia trazer importantes respostas para a dinâmica do acoplamento neurovascular-metabólico durante a ativação neuronal. Esta expectativa se justifica através de trabalhos presentes na literatura (e resultados obtidos neste trabalho), onde parece haver uma relação não-linear entre a atividade sináptica e a resposta hemodinâmica, que também pode variar com o estado basal. A variação do consumo de oxigênio, no entanto, tem se mostrado linearmente proporcional à atividade neuronal (Hyder *et al.* 2002).

Medidas diretas de $CMRO_2$ podem ser obtidas por diferentes formas, como PET e MRS. Atualmente, a forma mais comum para obter medidas de consumo de oxigênio em humanos é baseada em experimentos baseados em PET com ^{15}O (Mintum *et al.* 1984), embora sua aplicabilidade a estudos funcionais é limitada devido à baixa resolução temporal (Zhang *et al.* 2004). Técnicas de MRS que empregam contraste exógeno também têm sido usadas para medir $CMRO_2$ (Arai *et al.* 1991, Martin 2007).

Alternativamente, vários estudos baseados em fMRI têm obtido uma medida indireta de consumo de oxigênio através de seqüências de perfusão, capazes de adquirir simultaneamente sinais relacionados com CBF e BOLD (Davis *et al.* 1998, Kim *et al.* 1999, Hoge *et al.* 2005). Estes métodos de fMRI requerem a calibração de um fator entre o sinal BOLD e as variações de oxigenação e CBF, que tem sido obtido através de experimentos em condições de hipercapnia, e são baseados na hipótese de uma relação isometabólica durante hipercapnia e normocapnia, o que não parece ser verdade (Sicard and Duong 2005, Chiarelli *et al.* 2007). Além disso, a necessidade da condição hipercápica restringe esta técnica a aplicações clínicas.

Baseados neste fato, nossa proposta foi desenvolver um método alternativo para estimar $CMRO_2$ com melhor resoluções temporal e espacial. Assumindo que o tempo de trânsito vascular não varia ao longo do cérebro, propomos a utilização de métodos ópticos para calibrar o modelo BOLD, ao invés de procedimentos envolvendo hipercapnia. A utilização multimodal destas duas técnicas fornece uma nova ferramenta para o estudo do acoplamento neuro-vascular-metabólico, e permite a possibilidade de uma medida alternativa para investigar aspectos de neurociências fundamentais, além de distúrbios associados às disfunções metabólicas. Abaixo, apresentamos o modelo proposto e a aplicação do mesmo no estudo de estimulação de nervo mediano em humanos, que resultaram nas seguintes publicações:

- Mesquita R.C. *et al.* (2008), *Imaging oxygen consumption with near-infrared spectroscopy and fMRI simultaneously*, In: *Human Brain Mapping* (Melbourne, Australia).
- Mesquita R.C. *et al.* (submitted), *Use of simulatenous near-infrared spectroscopy and functional MRI recordings to image oxygen consumption during somatosensory cortex stimulation*, Neuroimage.
- Custo A. *et al.* (submitted), *Anatomical atlas-guided diffuse optical tomography of brain activation*, Opt. Expr.

5.1 Obtenção do consumo de oxigênio a partir de fMRI

5.1.1 O sinal de RM e o efeito BOLD

Os primeiros experimentos relacionados com ressonância magnética funcional (fMRI) datam do início da década de 90 (Ogawa *et al.* 1990). Desde então, esta metodologia vem emergindo e se consolidando como a principal técnica para o mapeamento funcional cerebral.

A obtenção de imagens cerebrais por ressonância magnética (MRI) é baseada na interação das propriedades do tecido com campos magnéticos (Buxton 2002, Huettel *et al.* 2003). Como diferentes tecidos têm diferentes propriedades magnéticas, a interação de cada tipo de tecido com um campo magnético estático produz efeitos de magnetização diferentes. A aplicação de um pulso de radiofrequência (RF) produz efeitos transientes da magnetização nuclear ao longo do cérebro. A utilização de três outros campos magnéticos auxiliares, conhecidos como gradientes de campo, codifica o sinal e permite a localização das moléculas de água - comumente usada como marcador -, produzindo uma imagem de RM com alta resolução espacial.

Por outro lado, sabe-se que a molécula de hemoglobina é diamagnética quando oxigenada, e paramagnética quando desoxigenada. Desta forma, a presença de HbR altera a susceptibilidade magnética, criando distorções no campo dentro e em volta dos vasos sanguíneos, produzindo uma pequena diferença no sinal de RM. Seguindo uma determinada ativação cerebral, o aumento de CBF leva mais sangue oxigenado na região ativada, diminuindo a quantidade de HbR presente na mesma região, de forma que as distorções no campo magnético são reduzidas, e o sinal de RM aumenta. Esta pequena variação de sinal (da ordem de 4%) produzida pela oxigenação sanguínea é conhecida como sinal BOLD, e a aquisição rápida de imagens subsequentes do cérebro pode ser usada para mapear uma ativação funcional.

Durante a aquisição, após a aplicação de um pulso de RF, o sinal $S(t)$ medido pela RM é proporcional à magnetização transversa do tecido (Buxton 2002):

$$S(t) = S_{max}e^{-t/T_2^*} \quad (5.1)$$

onde t é o tempo decorrido após o pulso de RF e S_{max} é a densidade de spins efetiva (o sinal que seria medido quando $t \rightarrow 0$). A aplicação de um pulso subsequente produz um súbito aumento no sinal de RM (eco) num certo instante $t = TE$ conhecido como tempo ao eco. T_2^* é o tempo de relaxação transversa aparente, que depende do campo magnético aplicado e do tecido. O inverso de T_2^* , $R_2^* = R_2^*(0) + R$, é a taxa de relaxação transversa, e pode ser escrita como a soma de dois termos: $R_2^*(0)$ é o valor de R_2^* na ausência de HbR, e R descreve a relaxação adicional produzida pela HbR. Assim, se assumirmos que durante uma ativação cerebral R seria o único parâmetro a mudar, o sinal BOLD produzido no instante TE pode ser escrito como:

$$BOLD = \frac{\Delta S}{S_0} = \frac{S_0 - S}{S_0} = e^{-TE \cdot \Delta R_2^*} - 1 \approx -TE \cdot \Delta R_2^* \quad (5.2)$$

onde $\Delta R_2^* = R - R_0$ e os sub-índices 0 denotam as grandezas durante o estado basal.

Desta forma, a questão principal torna-se descobrir como ΔR_2^* (ou R) varia com os parâmetros fisiológicos. Baseados em simulações numéricas e análises teóricas, Davis e colaboradores sugeriram uma dependência linear com CBV e uma lei de potência com a concentração local de HbR (e, conseqüentemente, com a fração de extração de oxigênio) como os principais agentes modificadores de R (Davis *et al.* 1998):

$$R = R(t) \propto V(t) \cdot E(t)^\beta \quad (5.3)$$

onde β é um valor entre 1 e 2 (vários estudos mostram que $\beta = 1,5$ é uma boa aproximação para ressonâncias de 1,5 - 3 T). Desta forma, a equação 5.2 pode ser reescrita como:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = M \left[1 - \frac{V}{V_0} \left(\frac{E}{E_0} \right)^\beta \right] \quad (5.4)$$

onde o valor de M é uma constante que depende do estado basal e da seqüência de pulsos de fMRI. Utilizando as diferentes relações fisiológicas expressas nos capítulos anteriores, podemos expressar o sinal BOLD em função de outros parâmetros fisiológicos. Usando a relação de Grubb (equação 1.2), por exemplo, pode-se escrever o sinal BOLD em função de CBF. Ainda, se considerarmos que no estado estacionário CBF e $CMRO_2$ estão relacionados pela concentração de oxigênio arterial C_a e pela fração de extração de oxigênio ($CMRO_2 = E \cdot C_a \cdot CBF$) (Zheng *et al.* 2002), pode-se obter uma relação para a determinação do consumo de oxigênio relativo¹:

$$cmro_2(t) = \frac{CMRO_2(t)}{CMRO_{2,0}} = \frac{E(t)}{E_0} f(t) , \quad (5.5)$$

e a equação 5.4 pode ser escrita em termos de CBF, E e das constantes α e β , que refletem as influências do volume sangüíneo e da [HbR] para o sinal BOLD, respectivamente.

O fato do sinal BOLD depender de variações recíprocas em CBF, CBV e $CMRO_2$, além do estado basal, torna difícil a interpretação da verdadeira origem deste sinal. Esta é uma das razões que torna este tipo de medida primariamente uma ferramenta de mapeamento da ativação, porém não muito útil para entender a fisiologia por trás da atividade neuronal.

5.1.2 O processo de calibração

As equações 5.4 e 5.5 fornecem um método para estimar variações no consumo de oxigênio durante uma atividade funcional. Medindo BOLD e CBF simultaneamente, é possível determinar $CMRO_2$, desde que M seja conhecido.

Para medir CBF e BOLD simultaneamente, pode-se usar técnicas de marcação de spin arterial (ASL), uma família de técnicas de perfusão em fMRI que possibilita medir CBF através da marcação de spins com pulsos de excitação aplicados num certo tempo, conhecido como de inversão (TI). Esta fase de marcação tem por objetivo inverter a

¹Em geral, assume-se que a concentração de oxigênio arterial é próxima de 100%, e praticamente não se altera.

magnetização total da água no sangue. Após um certo período, estes spins marcados entram na região cuja imagem deseja-se obter, e a aquisição do sinal é feita. Dentre as diferentes formas de marcação do tecido, uma delas usa uma única bobina para marcar e adquirir o sinal, e os dois processos são realizados em locais muito próximos, em diferentes períodos de tempo. Esta forma é conhecida como ASL pulsado, ou pASL. A marcação do sangue reduz a magnetização total do tecido e, conseqüentemente, a intensidade do sinal de RM. O sinal adquirido neste instante (conhecido como sinal ou imagem marcada, S_L), medido a cada TE, é proporcional ao CBF (Lu *et al.* 2006):

$$S_L = S_0 \left(1 - \frac{CBF}{\lambda} \cdot \gamma \right) e^{-TE/T_2^*} \quad (5.6)$$

onde λ representa o coeficiente de partição da água² e γ é um termo constante proveniente das equações de Bloch, e proporcional ao tempo de inversão TI. Assim, a subtração de uma imagem controle, onde não há spins marcados, de uma imagem marcada é proporcional ao CBF:

$$S_{ASL} = S_C - S_L = \frac{S_0 \gamma}{\lambda} CBF \cdot e^{-TE/T_2^*} \quad (5.7)$$

Como todos os outros parâmetros são constantes, a variação do sinal de ASL é uma medida direta da variação de CBF no cérebro.

O outro problema consiste em determinar M . A proposta, inicialmente sugerida por Davis e colaboradores (Davis *et al.* 1998) e muito utilizada até hoje, consiste em explorar um fenômeno bem estabelecido, porém não muito bem entendido: a utilização de um experimento em hipercapnia. Ao medir CBF e BOLD nestas condições durante o estado basal, há a ocorrência de vasodilatação, mas o consumo de oxigênio não se altera. Isso faz com que a equação 5.5 seja igual à unidade, e o sinal BOLD dependerá apenas de CBF e M . Com as duas primeiras determinadas experimentalmente, é possível encontrar um valor para a última. Esta etapa é conhecida como calibração do sinal BOLD. Assumindo que M não varia sob hipercapnia ou normocapnia, pode-se então encontrar E numa condição

²Este valor pode ser calculado através da razão entre os conteúdos de água no cérebro e no sangue, e é da ordem de 0,90 ml/g.

de normocapnia através da equação 5.4, e a partir daí determinar $CMRO_2$ para toda a região da imagem.

Embora inteligente, esta solução assume hipóteses, no mínimo, discutíveis. Por exemplo, estudos recentes têm demonstrado que a fisiologia do estado basal se altera de acordo com o nível de CO_2 , o que faz com que o valor de M também mude (Sicard and Duong 2005, Chiarelli *et al.* 2007). A relação de Grubb, necessária para esta metodologia, vale no estado estacionário, o que não é o caso para curtos períodos de estimulação. E, mesmo que uma relação em forma de potência ainda seja plausível nestes casos, o valor do expoente de Grubb não deve ser o mesmo. Além disto, a realização de um experimento de hipercapnia controlado não é uma atividade simples de ser conduzida, tanto para o pesquisador quanto para o indivíduo que está dentro de um aparelho de RM.

5.2 O uso de NIRS para a calibração de fMRI

Na seção anterior, vimos que é possível determinar BOLD e CBF a partir de ASL-fMRI. O acoplamento de NIRS ao experimento de ressonância permite determinar, além das variáveis já citadas, variações da oxigenação numa certa região. Assim, nossa proposta foi utilizar esta informação para calibrar o sinal BOLD e, com isso, estimar o consumo de oxigênio no cérebro.

A fração de extração de oxigênio pelo tecido pode ser calculada a partir da equação 4.3 do modelo do balão:

$$\frac{E(t)}{E_0} = \frac{q(t)}{v(t)} + \frac{\tau}{f_{in}(t)} \left[\frac{dq(t)}{dt} - \frac{q(t)}{v(t)} \frac{dv(t)}{dt} \right] \quad (5.8)$$

Assim, na região onde há a presença de optodos, é possível determinar $q(t)$ e, conseqüentemente, $E(t)$ e $CMRO_2(t)$. Esta abordagem foi utilizada por Hoge e colaboradores (Hoge *et al.* 2005), mas limita a estimativa do consumo de O_2 à região coberta pelos optodos.

Para criar imagens metabólicas, propomos uma metodologia que usa a abordagem de Hoge *et al.* como etapa de calibração do sinal BOLD, ao invés do uso de hipercapnia.

Criando uma estrutura de otimização análoga à descrita na Seção 4.2 (e no Apêndice B), utilizamos a região comum ao NIRS e fMRI para estimar o sinal BOLD a partir do modelo composto pelas equações 5.4 e 5.8, e através da comparação com o sinal BOLD medido, otimizar o vetor de entrada. Matematicamente, resolvemos o problema:

$$\text{Min } f(\mathbf{x}) = \sum_{t=1}^N \frac{\left(Y_{meas}^{(t)}(\mathbf{x}) - Y_{pred}^{(t)}(\mathbf{x}) \right)^2}{R_t} \quad (5.9)$$

onde Y é o valor médio do sinal BOLD medido ao longo do canal formado pela i -ésima fonte e j -ésimo detector óptico, e R representa a variância deste valor. Neste problema, $\mathbf{x} = (\tau \ M \ \beta \ \alpha)^T \in \mathbb{R}^4$. A solução fornece o valor de M de forma direta e na mesma condição experimental em que a atividade funcional foi realizada. Assumindo que o tempo de trânsito permanece o mesmo em todas as regiões do cérebro, utilizamos o valor de M encontrado para estimar a fração de extração de oxigênio e, posteriormente, $CMRO_2$ em todo o cérebro. A Figura 5.1 ilustra todos os passos da metodologia.

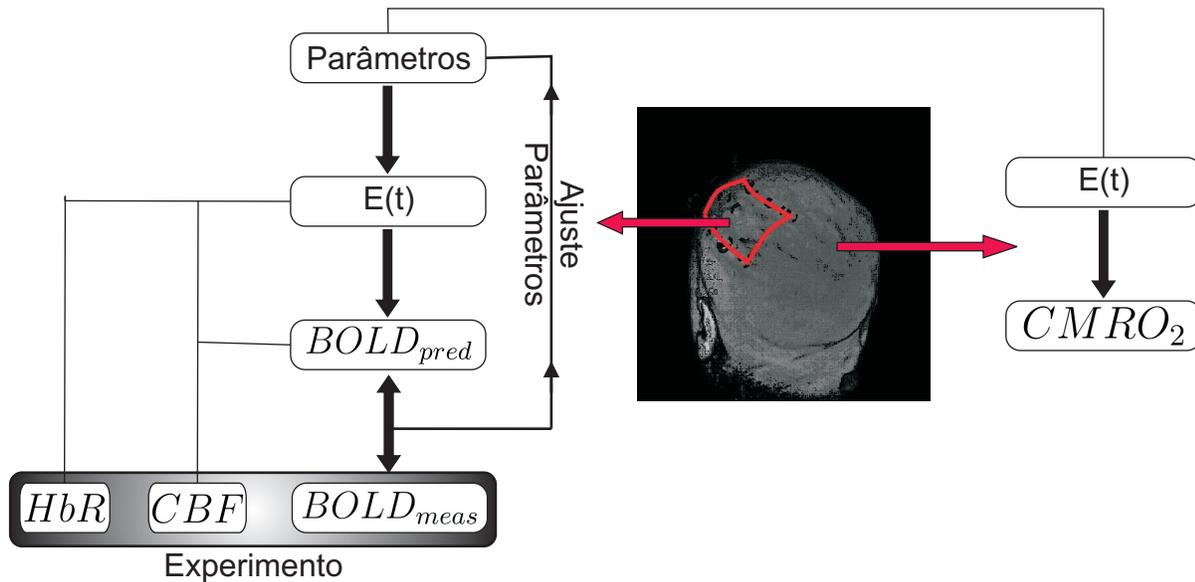


Figura 5.1: Desenho esquemático do processo de estimativa do consumo de oxigênio em todo o cérebro.

Nossa abordagem fornece uma alternativa mais fácil e fisiologicamente mais plausível

para a obtenção de imagens metabólicas cerebrais. Utilizamos NIRS para calibrar fMRI, e com isso obter imagens de $CMRO_2$. Usando estatística univariada, é possível obter mapas de ativação metabólicos devido a um determinado estímulo. Para isto, utilizamos hipóteses mais aceitáveis do que as utilizadas durante hipercapnia. Por exemplo, o fato de determinarmos M nas mesmas condições experimentais em que o experimento é feito leva a uma medida direta e mais próxima do valor real desta constante. A hipótese do tempo de trânsito permanecer o mesmo também não é verdade, mas constitui-se numa aproximação mais próxima da realidade do que a relação isometabólica assumida com a hipercapnia.

5.3 Aplicação do método no córtex sensorial de humanos

5.3.1 Protocolo Experimental

Utilizamos 7 voluntários saudáveis, destros, todos homens, com idade média de (28 ± 4) anos, para uma sessão de fMRI e NIRS combinados. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Massachusetts General Hospital, local onde as medidas foram realizadas. Todos os voluntários deram seu consentimento por escrito. O protocolo funcional consistiu de estimulação do nervo mediano no pulso direito, de forma aleatória, com 3 Hz de frequência, no limiar do movimento e por 4 s de duração, como descrito na Seção 3.3.

As medidas de NIRS foram adquiridas com um sistema de onda contínua (CW4, TechEn Inc.). Posicionamos o conjunto de optodos de forma a cobrir a região somatosensorial primária (SI) contra-lateral ao estímulo. Utilizamos uma geometria retangular, com 2 linhas de optodos-fontes intercaladas com outras 2 linhas de optodos-detectores. As linhas com as fontes tinham 4 optodos, enquanto as com detectores tinham 5. As fibras

ópticas que comunicavam os optodos ao resto do sistema tinham 10 m de comprimento, suficiente para atravessar toda a sala de controle e chegar dentro do magneto do tomógrafo de ressonância. O processamento dos dados foi feito de modo análogo ao descrito na Seção 3.3.

Para a aquisição de fMRI, utilizamos uma seqüência de pulso pASL (pulsed Arterial Spin Labeling) num equipamento de ressonância magnética de 3 T (Siemens Allegra MR Scanner, Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemanha) com a geometria de marcação PICORE (Wong *et al.* 1997) com saturação Q2TIPS (Luh *et al.* 1999), de forma a controlar a duração da marcação de água. Este esquema permite a aquisição de sinais BOLD através das imagens controle, sem marcação. Para formar as imagens, adquirimos 10 fatias de 5 mm de espessura com uma resolução planar de 3,5 mm. Os tempos de repetição entre imagens subseqüentes (TR) e de eco (TE) foram de 2 s e 20 ms, respectivamente ($\theta = 90^\circ$). Ao fim das aquisições funcionais, realizamos séries estruturais com uma seqüência MPAGE ponderada por T1 (resolução de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, TR/TE/ $\alpha = 2,53 \text{ s}/1,64 \text{ ms}/7^\circ$), e duas seqüências flash, com dois ângulos de flip diferentes (resolução de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, TR/TE/ $\alpha = 20 \text{ ms}/1,85 \text{ ms}/5^\circ$ e 30°), a fim de segmentar a região extra-cerebral.

Após o scan, as séries funcionais passaram por um processo de correção de movimento (espacial e temporal) e normalização com um filtro gaussiano de 5 mm de largura³. Num segundo momento, as imagens foram carregadas em Matlab e separadas entre marcadas e controle. Para estimar CBF, usamos a estratégia de subtração na vizinhança (Liu and Wong 2005), que tende a eliminar eventuais contaminações do efeito BOLD na dinâmica temporal de CBF, e corrigir a diferença de tempo entre as imagens marcadas e as controle (Lu *et al.* 2006), além de manter o TR da nova série igual ao TR da aquisição, 2 s. Especificamente, a diferença entre a i -ésima imagem controle C_i e a imagem marcada L_i

³Esta primeira etapa do processamento foi feita utilizando o software AFNI (Cox 1996, Cox and Hyde 1999).

é dada por

$$D_i = C_i - \frac{L_i + L_{i+1}}{2} \quad (5.10)$$

A série composta apenas pelas imagens não marcadas corresponderam à resposta BOLD. Para trazer todas as séries à mesma resolução temporal, tanto CBF quanto BOLD foram interpolados e re-amostrados a 1 Hz. Para cada um dos dois tipos de dados, as séries de um mesmo indivíduo foram concatenadas e a resposta hemodinâmica foi calculada por um processo de deconvolução utilizando um modelo linear geral, sem assumir nenhum tipo de resposta canônica. Para cada voluntário, foi gerado um mapa estatístico e as regiões de interesse foram identificadas através de um teste de hipóteses (teste F). Estes últimos três passos foram realizados através do software de análise de dados AFNI (Cox 1996, Cox and Hyde 1999).

Para correlacionar os resultados obtidos através das duas técnicas diferentes, colocamos cápsulas com vitamina E sobre os optodos, de forma que os mesmos possam ser reconhecidos nas imagens de RM (Figura 5.2(a)). Do ponto de vista temporal, um cartão auxiliar de aquisição de dados (NI 6023E, National Instruments, Austin, TX, EUA) foi conectado e sincronizado com o CW4. Desta forma, foi possível coletar todos os picos de RF gerados a cada TR da ressonância e o início de cada estímulo simultaneamente (Figura 5.2(b)).

5.3.2 Resultados e discussão

Localização da ativação

Um dos avanços ao realizar multimodalidade entre as técnicas é a possibilidade de fazer análises individuais que não poderiam ser feitas com as mesmas técnicas separadamente. No presente caso, o uso de NIRS e fMRI combinados simultaneamente permite a criação de imagens de consumo de oxigênio para cada indivíduo com alto grau de correlação espacial e temporal.

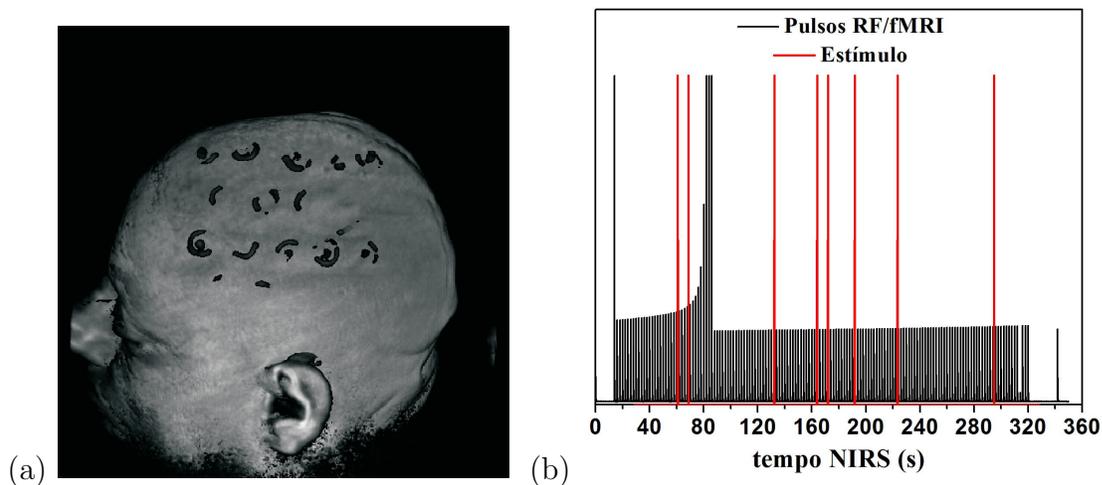


Figura 5.2: Sincronização (a) espacial e (b) temporal entre as diferentes técnicas e o protocolo de estimulação.

A Figura 5.3 mostra os resultados obtidos para um dos indivíduos analisados. Todo o resto do grupo apresentou resultados similares. Pelo NIRS, um resumo da variação da oxigenação para todos os canais medidos pode ser visto no lado esquerdo da Figura. Ao lado direito, apresentamos os mapas de ativação para BOLD e CBF.

Comparando as duas técnicas, é possível notar a concordância espacial da região tida como ativada. Os mapas obtidos através de RM, usando estatística F ($p < 0,01$), mostram ativação no córtex somatosensorial primário (SI) contralateral ao estímulo, como esperado em experimentos de estimulação de nervo mediano (Ferretti *et al.* 2007). O sinal ASL é mais ruidoso que o sinal BOLD, uma vez que este é proporcional à diferença de duas aquisições consecutivas, diminuindo a relação sinal-ruído. No entanto, ainda é possível perceber o foco de ativação nestes sinais, no mesmo limiar de nível de significância utilizado para o sinal BOLD⁴.

A ativação média, medida entre todos os voluntários, é dada na Figura 5.4. É possível notar que o foco de ativação torna-se mais claro no mapa de ASL, enquanto os ruídos são

⁴Para um nível de significância menor, o foco de ativação é ainda mais claro (não mostrado na figura).

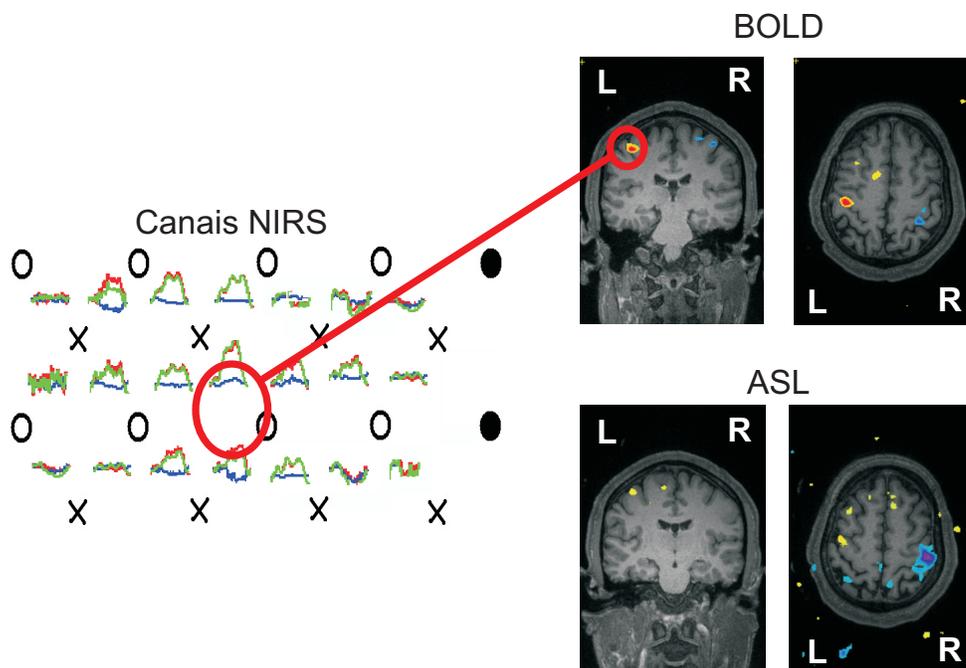


Figura 5.3: Resultados de ativação obtidos via NIRS (esquerda) e fMRI (direita) para um único indivíduo, registrada numa imagem estrutural de alta resolução; L e R indicam esquerda e direita, respectivamente.

eliminados. A dinâmica temporal de todas as variáveis medidas na região de interesse, representada pelo círculo vermelho nos mapas de ativação, também pode ser vista na mesma figura.

A dinâmica temporal entre os observáveis de cada uma destas técnicas também mostra bastante concordância. A comparação da série temporal entre o sinal BOLD e as outras grandezas mostrou uma maior correlação com HbR, em concordância com resultados previamente publicados na literatura (Huppert *et al.* 2006b, Huppert *et al.* 2006c). Esta correlação é mais uma evidência direta que este tipo de sinal de fMRI é consequência da variação de HbR no cérebro, embora todos os seus mecanismos de geração ainda não sejam bem entendidos.

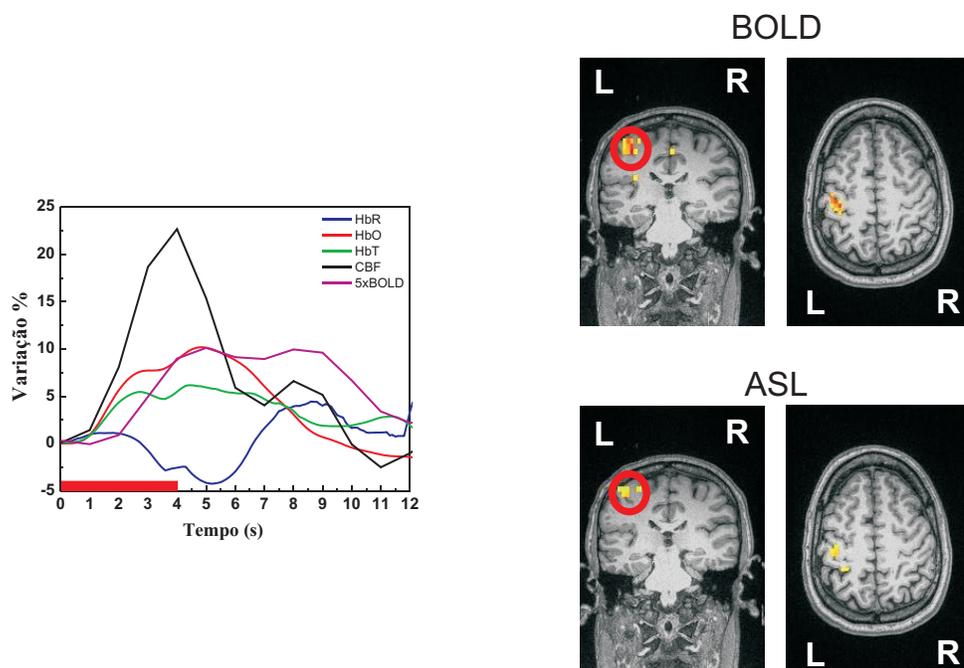


Figura 5.4: Lado esquerdo: curvas de resposta hemodinâmica média na região de interesse. Linha vermelha indica o período de estimulação. Lado direito: mapas de ativação médio obtidos via ASL-fMRI.

Determinação da imagem metabólica

Utilizando a metodologia descrita na Seção 5.2, foi possível estimar o vetor de estado que melhor descreve os dados experimentais para cada indivíduo. Os valores médios, obtidos entre todos os indivíduos, de cada um dos parâmetros são apresentados na tabela 5.5(a). O intervalo de confiança ($p < 0.05$) de cada um dos parâmetros que compõem o vetor de entrada foi testado através de simulação MCMC (Apêndice B), de forma análoga à apresentada na Seção 4.2.3. Os resultados podem ser vistos na Figura 5.5(b), e indicam que a estimativa média obtida através do processo de otimização se encontra aproximadamente na mediana do intervalo de confiança determinado por MCMC.

A partir da calibração de M para cada indivíduo, determinamos $CMRO_2$ em todo o cérebro. A imagem da máxima variação do consumo de oxigênio durante a atividade fun-

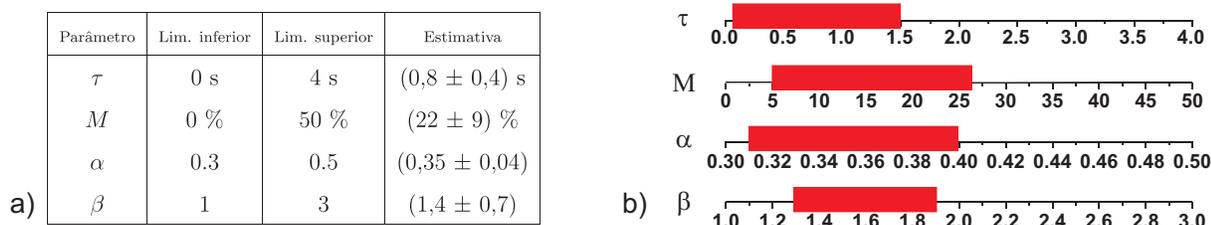


Figura 5.5: a) Valores médios obtidos para cada parâmetro estimado. b) Estimativas obtidas através da simulação de MCMC para o vetor de estados do processo de otimização.

cional de um indivíduo pode ser vista na Figura 5.6(a). Nota-se um aumento de $CMRO_2$ na região próxima ao aumento hemodinâmico mostrado por BOLD e ASL, também localizado em SI. Para determinar a dinâmica do metabolismo de oxigênio, calculamos a média de $CMRO_2$ na região de interesse, que pode ser vista na Figura 5.6(b). Quando comparada com a variação dos observáveis medidos na mesma região, nota-se uma concordância temporal previamente descrita na literatura (Hoge *et al.* 2005), e uma boa correlação temporal com CBF.

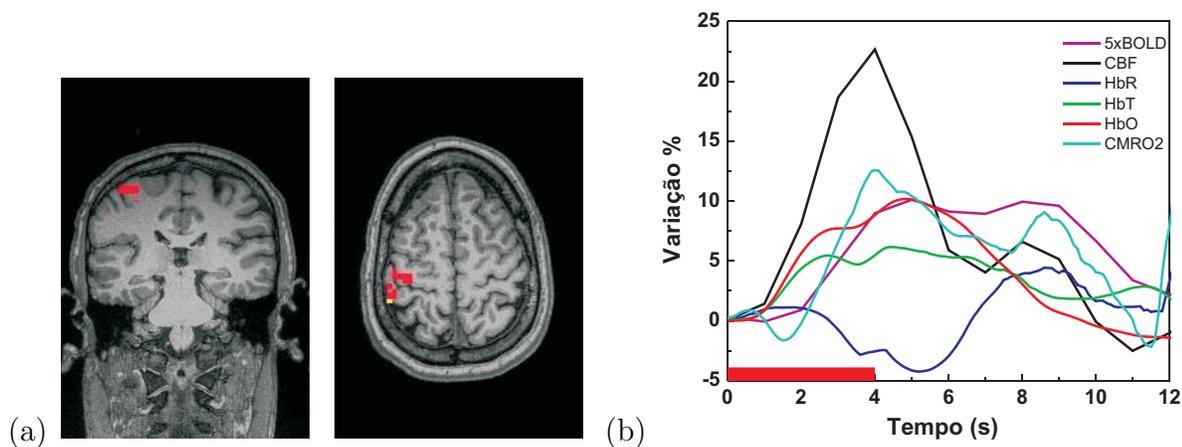


Figura 5.6: (a) Mapas de consumo de oxigênio devido à estimulação do nervo mediano. (b) Dinâmica temporal dos observáveis medidos e de $CMRO_2$ na região de interesse.

Segmentação e reconstrução da imagem

A partir das imagens estruturais MPRAGE segmentamos as áreas cerebrais, enquanto a região extra-cerebral foi segmentada utilizando as duas seqüências estruturais multi-echo coletadas na RM. Ambas as segmentações foram realizadas com o software FreeSurfer (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki>).

Em seguida, localizamos todos os optodos nas imagens anatômicas segmentadas e fizemos a projeção de cada um sobre o escalpo para determinar as reais coordenadas dos mesmos no espaço da imagem. Estes pontos serviram como vetor de entrada para simular a migração de fótons através do cérebro, usando simulação de Monte Carlo em Matlab⁵. Basicamente, a simulação modelava a trajetória de um conjunto de fótons (fluência) através dos diferentes tecidos, utilizando o espaço da imagem como espaço padrão da simulação. A cada iteração, dois eventos eram considerados: absorção e espalhamento. A probabilidade de ocorrência de cada um foi proporcional ao coeficiente de absorção e espalhamento, e variou de acordo com o tecido no qual se encontravam os fótons (tabela 5.1). Para cada par fonte/detector, lançamos $3 \cdot 10^8$ fótons.

Tabela 5.1: *Coefficientes ópticos das diferentes estruturas cerebrais utilizados na simulação de Monte Carlo.*

Estrutura	μ_a (mm^{-1})	μ_s (mm^{-1})
escalpo	0,0159	0,8
crânio	0,0101	1,0
líquor	0,0004	0,01
cérebro	0,0178	1,25

A partir destas simulações, fizemos a reconstrução das imagens ópticas utilizando os dados coletados via NIRS. Utilizando o registro de um atlas óptico criado a partir do modelo padrão do MNI (Custo 2008, Custo *et al.* submitted), verificamos as localizações

⁵Parte do código utilizou bibliotecas de C feitas anteriormente ao presente projeto.

correspondentes à área ativada. Os mapas funcionais mostraram ativação na região delimitada por SI e SII em 6 dos 7 indivíduos (Figura 5.7), corroborando a concordância espacial já mostrada através dos mapas obtidos pelas curvas de oxigenação (Figura 5.3).

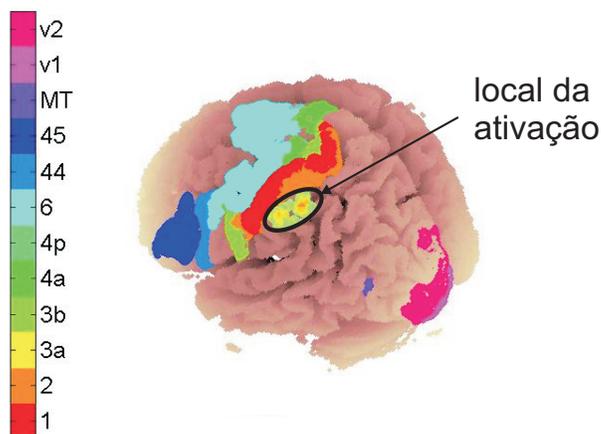


Figura 5.7: *Reconstrução do sinal óptico medido sobre a segmentação do cérebro de um indivíduo; a área ativada encontra-se circulada. A barra de cores indica as diferentes estruturais cerebrais, de acordo com o mapa de Brodmann.*

Todos os resultados acima mostram a utilidade de experimentos multimodais. Em particular, a combinação de fMRI e NIRS pode vir a contribuir para a obtenção de dados com alta resolução temporal (proveniente de NIRS) e espacial (proveniente de fMRI). Além disso, mostramos que essa junção também pode ser utilizada para um melhor entendimento do acoplamento neuro-vascular-metabólico durante o potencial evocado. Em particular, a metodologia de calibração de fMRI via NIRS, proposta neste trabalho, permite criar mapas metabólicos a partir do consumo de oxigênio com hipóteses mais fidedignas à fisiologia funcional, e sem a necessidade de hipercapnia. Tal procedimento representa um avanço em neuroimagem dos pontos de vista metodológico, biofísico (uma outra ferramenta para o entendimento do acoplamento durante a ativação cerebral) e clínico (utilização de mapas metabólicos de forma prática e rápida para o estudo de doenças cerebrais, por exemplo). No entanto, questões acerca da validade dos resultados obtidos ainda ficam em aberto, e uma futura comparação entre o método proposto neste

trabalho e aquele sugerido por Davis *et al.* (1998) pode trazer um melhor entendimento do significado da constante M no modelo do sinal BOLD, bem como validar nosso modelo numa situação de hipercapnia.

Capítulo 6

Utilização de NIRS para o estudo de flutuações fisiológicas

Devido à alta sensibilidade de detecção de variações da absorção, a NIRS apresenta-se como uma técnica muito sensível às variações fisiológicas, como pulsação cardíaca, sinais respiratórios e variações da pressão sanguínea, presentes no escalpo e nos tecidos subseqüentes. No Capítulo 3 vimos que o sinal óptico pode ser decomposto num conjunto de fatores que o influenciam, como aqueles relacionados com a autoregulação fisiológica, cuja contribuição ao sinal no cérebro pode ser considerada através de uma convolução com a função de transferência representando o sistema neuronal.

A princípio, esta característica intrínseca de sensibilidade à fisiologia pode ser encarada como um problema geral associado às técnicas ópticas, constituindo-se como mais uma fonte de ruído do sinal. No entanto, mais do que simplesmente uma fonte de ruído, a fisiologia pode ser de interesse em estudos cerebrais. Alguns estudos têm utilizado abordagens baseadas em espaço de estados para modelar flutuações fisiológicas incluídas no sinal óptico (Diamond *et al.* 2006), e com isso inferir e testar hipóteses acerca da neurofisiologia do potencial evocado, além de melhorar a estimativa da resposta funcional.

Neste capítulo, procuramos analisar a influência de variações fisiológicas, mais especificamente a pressão sangüínea (PS), na composição do sinal óptico. Além disso, buscamos correlacionar e estudar a conectividade espacial do cérebro durante o estado basal, utilizando uma perspectiva óptica, e sua relação com os aspectos fisiológicos presentes no sinal óptico. Os resultados obtidos também compõem o seguinte manuscrito a ser enviado para publicação:

- Mesquita R.C. *et al.* (in prep), *Evidence of a spatial-temporal vascular connectivity in humans during resting state with NIRS*

6.1 Influência da fisiologia cerebral para o sinal óptico

Estudos recentes mostram a influência de determinados marcadores fisiológicos em métodos ópticos. Franceschini *et al.* (2006) mostraram a influência da pressão sangüínea e da respiração, por exemplo, através da correlação entre medidas fisiológicas independentes e o sinal óptico durante o estado basal e ativação funcional. Modelos para acoplar estas variáveis à neurofisiologia subjacente no cérebro têm sido desenvolvidos e testados empiricamente (Diamond *et al.* 2006).

Baseado no modelo de convolução linear para a composição do sinal óptico, analisamos a dependência deste com a pressão sangüínea. Para tal, adquirimos medidas ópticas e de oscilação da pressão de forma simultânea durante o estado basal. Para realizar as medidas ópticas, utilizamos o sistema CW6 (Seção 2.5.3), com 16 fontes e 30 detectores dispostos na geometria hexagonal. Para cada indivíduo, a geometria foi posicionada em diferentes regiões do cérebro, obtendo sinais dos lobos frontal, temporal e parietal, e sempre cobrindo os lados simétricos (ipsi e contralateral). As medidas de oscilação de pressão sangüínea foram obtidas a partir de um transdutor de pressão construído no laboratório, cuja saída constitui-se num tubo com água que se encaixa sobre o dedo indicador (Siegel 2004). As aquisições duraram aproximadamente 20 minutos, divididas em 3 blocos de 5 minutos.

Ao todo, foram utilizados 11 indivíduos, todos saudáveis e com idades entre 18 e 35 anos. Todo o procedimento foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do MGH (Charlestown, MA, EUA).

Em cada indivíduo, os sinais ópticos de todos os pares fonte-detector foram filtrados com um filtro passa-banda entre 0,02 e 0,7 Hz. Uma vez que as medidas foram coletadas no estado basal, assumimos que a única contribuição significativa para o sinal óptico seria proveniente das oscilações de pressão sangüínea, de forma que

$$\text{Sinal Óptico} \approx f_{PS} \otimes U_{PS} + \dots, \quad (6.1)$$

e estimamos a função de transferência entre estes dois estados em cada par fonte-detector. A Figura 6.1(a) mostra a média desta função de transferência para um único indivíduo. Pode-se notar a presença de oscilações fortes e rápidas, que podem ser relacionadas com o batimento cardíaco, seguidas de oscilações mais lentas e menos intensas, representando variações produzidas pelas ondas de Mayer (Huppert 2007a). Nota-se, portanto, que o sinal óptico pode ser utilizado para caracterizar o sistema que relaciona oscilações de pressão sangüínea com variações neurofisiológicas, abrindo um novo campo de estudo nesta área.

Num segundo momento, fizemos o caminho oposto: usando a função de transferência obtida em cada par, tentamos reconstruir o sinal óptico a partir da convolução direta da medida fisiológica com a respectiva função resposta. Como exemplo, a Figura 6.1(b) mostra a comparação entre o sinal óptico medido (preto) e o resultado da convolução “função resposta \otimes medida PS” para um par fonte-detector localizado no lobo parietal de um indivíduo. Em geral, notamos que a convolução pode reproduzir as oscilações mais lentas do sinal óptico, porém é incapaz de acompanhá-lo nas frequências mais altas. Medimos a correlação temporal R entre as duas curvas para cada par em cada indivíduo:

$$R(i, j) = \frac{\sigma_{ij}}{\sqrt{\sigma_{ii}\sigma_{jj}}} \quad (6.2)$$

onde σ_{ij} corresponde à matriz de covariância entre os valores dos dois vetores. Os valores de R obtidos nos diferentes canais ópticos ficaram entre 0,5 e 0,65, enquanto o valor

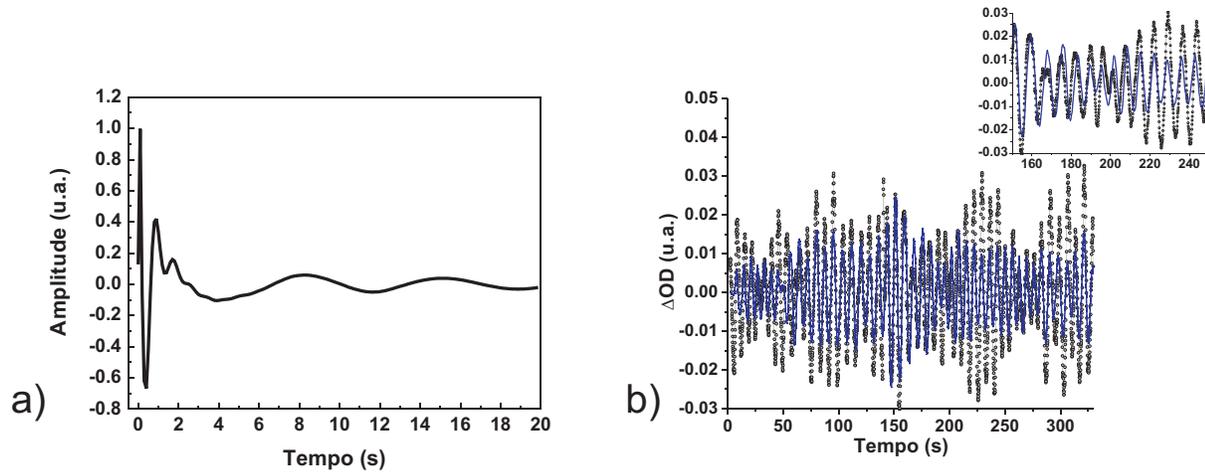


Figura 6.1: a) Função resposta estimada através da deconvolução direta dos sinais medidos. b) Resultados para uma sessão de 5,5 minutos de um voluntário. Os pontos e a curva representam o sinal óptico medido e a reconstrução do sinal a partir da função resposta estimada e dos dados de PS.

médio foi de $(0,54 \pm 0,23)$. Estes baixos valores de correlação mostram que, embora o sinal óptico medido sobre o escalpo seja sensível à variação de pressão sanguínea, e esta contribua de forma significativa para o sinal medido, este único regressor não é capaz de reproduzi-lo. Em outras palavras, o sinal intrinsecamente óptico é reflexo de mais fatores do que somente as oscilações de pressão, e que também são capazes de alterar os coeficientes ópticos no cérebro.

6.2 Conectividade no estado basal

A partir da medida de correlação entre os diferentes pares do sinal óptico, pode-se construir um mapa de correlação para analisar a conexão entre os sinais medidos nas diferentes partes do cérebro. Este mapa evidencia a relação espaço-temporal no cérebro, uma vez que a correlação é tomada entre os diferentes canais ao longo dos vinte minutos no repouso.

Para testar nossa hipótese, utilizamos dados previamente publicados onde os sinais ópticos foram registrados ao longo de todo o escalpo durante o estado basal, conjuntamente com dados de pressão sanguínea independentes (Franceschini *et al.* 2006). Para tal, os autores utilizaram um sistema óptico contínuo CW5, com 32 fontes e 32 detectores, numa geometria capaz de cobrir todo o cérebro (Figura 6.2). As medidas de pressão foram obtidas a partir do mesmo equipamento descrito na seção anterior.

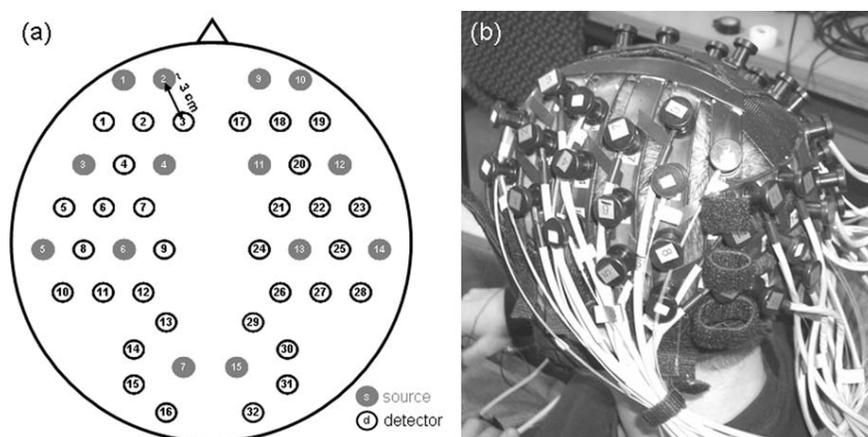


Figura 6.2: Geometria usada para cobrir todo o escalpo (retirado de Franceschini *et al.* 2006).

Para cada um dos 11 indivíduos, normalizamos as intensidades do sinal óptico em cada instante de tempo dividindo o valor da intensidade em cada canal pelo valor de intensidade máxima encontrada naquele instante de tempo. Este procedimento tem por finalidade minimizar efeitos de tendência globais, que podem atrapalhar a isolar os efeitos de conectividade que buscamos (Greicius *et al.* 2003). Em seguida, escolhemos um dos pares fonte-detector como semente, e calculamos a correlação desta semente com todos os outros canais. O valor de R foi então projetado para formar uma imagem de correlação. Repetimos o processo para cada par como semente, em cada indivíduo. A Figura 6.3 mostra imagens de correlação para 4 sementes num indivíduo, escolhidas em diferentes regiões da geometria. Em todas elas, é possível notar que os canais que apresentaram uma maior correlação espaço-temporal com cada semente são justamente aqueles posicionados

de forma simétrica no cérebro.

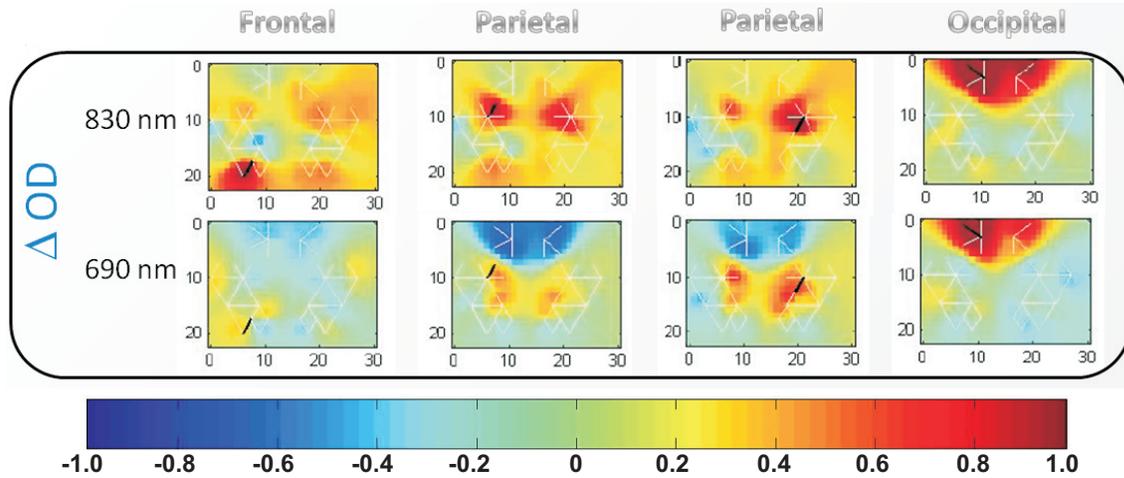


Figura 6.3: *Imagens de correlação entre a semente (representada pela linha preta) e os outros canais (linhas brancas), para um único indivíduo no estado basal. Na figura, a correlação foi feita em 4 regiões diferentes, todas utilizando o sinal de ΔOD .*

A princípio, o resultado acima sugere uma forte conectividade vascular no estado basal. Mas, como foi discutido na seção anterior, parte desta correlação pode ser devida às relações fisiológicas, que são produzidas em diferentes sistemas do corpo humano e chegam ao cérebro de forma generalizada e relativamente homogênea, como a pressão sanguínea. Na busca para melhor entender o real significado do mapa acima, quantificamos a influência da pressão sanguínea no mapa de correlação calculando a correlação das sementes escolhidas com os outros canais no produto da convolução das oscilações de pressão com as respectivas funções de transferências obtidas através do processo de deconvolução mencionado na seção anterior. O mapa de correlação criado a partir da reconstrução do sinal de PS pode ser visto na Figura 6.4(a), e mostra que os diferentes canais possuem maior correlação entre si, como era esperado para a contribuição de um sinal fisiológico.

A subtração desta reconstrução através da PS do sinal óptico remove a contribuição da principal flutuação fisiológica no sinal. A correlação entre os resíduos seria, portanto, um

parâmetro mais indicado para analisar conectividades vasculares. Este mapa é mostrado na Figura 6.4(b) para as mesmas 4 sementes analisadas anteriormente, e revela uma alta correlação espaço-temporal entre uma semente e sua região simetricamente oposta. Esta correlação tem origens vasculares, pois não pode ser atribuída às flutuações fisiológicas somente, mostrando uma conexão da rede vascular simétrica mesmo no estado basal.

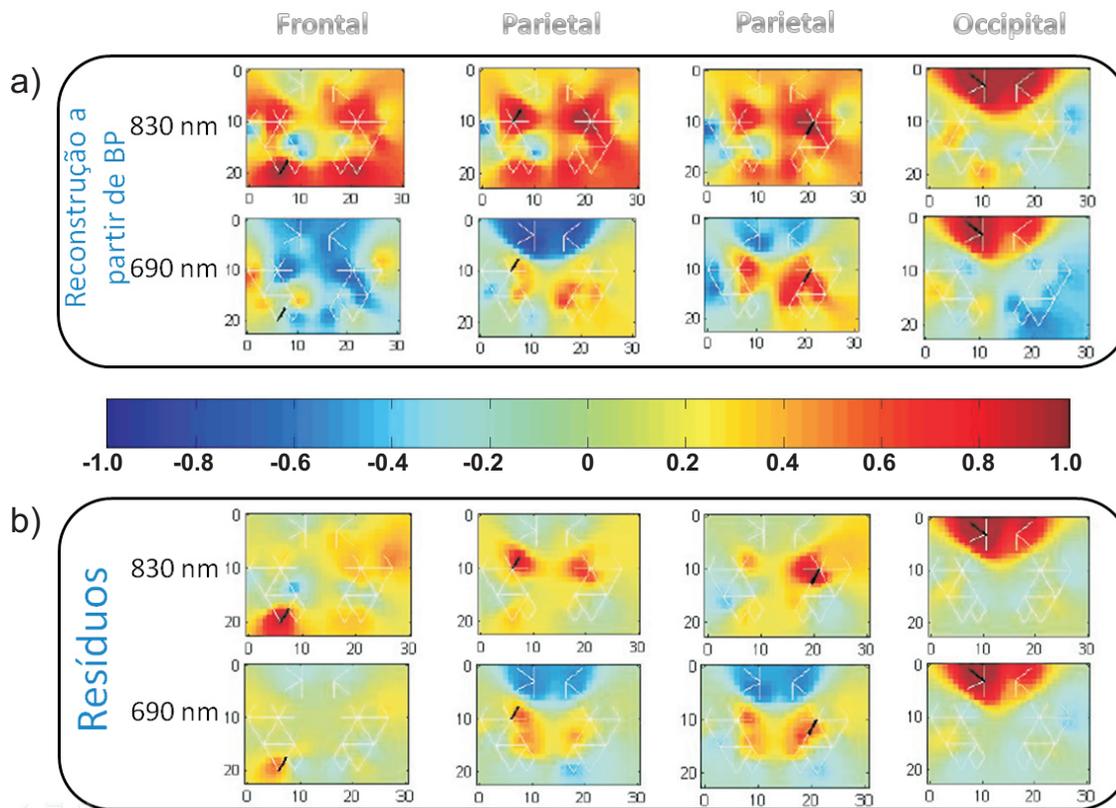


Figura 6.4: Mapas de correlação num indivíduo para 4 sementes diferentes feitas a partir a) da convolução entre o sinal medido de PS e a função resposta de cada canal e b) da subtração entre o sinal óptico e a reconstrução do sinal a partir da PS.

Parece ser surpreendente a existência desta sincronização do sinal óptico entre os hemisférios. A origem deste efeito pode refletir flutuações na hemodinâmica cerebral, como a oxigenação ou CBF, ocorridas mesmo durante o repouso. Neste caso, esta correlação poderia ser explicada através de oscilações vasomotoras. Apesar de alguns trabalhos já

terem observado este efeito com fMRI (Greicius *et al.* 2003, Buckner and Vincent 2007), este trabalho mostra pela primeira vez tais correlações espontâneas com métodos ópticos. Este tipo de ferramenta também pode ser relevante para entender condições clínicas que provavelmente afetam a anatomia cerebral, como AVC, doença de Alzheimer e autismo.

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas

Este trabalho teve como principal objetivo estudar o acoplamento neuro-vascular-metabólico subjacente à dinâmica cerebral, e propor metodologias para sua melhor compreensão. Optamos pela utilização dos métodos ópticos já presentes em neurociências como ferramenta central para o desenvolvimento deste estudo. Em certos momentos, a abordagem de outras técnicas fez-se necessária, de forma que medidas fisiológicas, eletrofisiológicas e de ressonância magnética funcional também estiveram presentes ao longo do trabalho.

Num primeiro passo, ajudamos a desenvolver e caracterizar um equipamento de NIRS-DOT junto à TechEn, Inc. (Milford, MA, EUA). O CW6 opera em modo contínuo, com até 32 lasers e 32 detectores simultâneos e demultiplexação instantânea, o que permite a visualização dos dados obtidos em tempo real. Além disso, o CW6 registra uma faixa dinâmica de operação maior do que 80 dB em todos os pares fonte-detector, o que nos permite adquirir sinais ópticos confiáveis com detectores localizados a diferentes distâncias de uma dada fonte, sem saturar os canais mais próximos ou ter os mais distantes no nível de ruído. Esta característica é importante para certas geometrias, como a hexagonal, que pode adquirir sinais com maior relação sinal-ruído e cobrir uma maior região do escalpo, facilitando a reconstrução tomográfica (Joseph *et al.* 2006). Uma versão deste

equipamento, com 10 fontes e 20 detectores, foi recentemente adquirida pelo grupo de Neurofísica do Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas, e é o primeiro equipamento de NIRS-DOT disponível no Brasil.

O equipamento recém-desenvolvido nos permitiu estudar o acoplamento neuro-vascular através de experimentos em humanos. Com ele, pudemos testar a relação entre a resposta hemodinâmica (medida através da oxigenação) e a duração do estímulo aplicado. Reproduzimos resultados bem conhecidos na literatura, referentes a tarefas motoras, com dois paradigmas diferentes: um paradigma em bloco, com 20 s de duração; e outro event-related, com 2 s de duração. Este experimento nos possibilitou perceber as diferenças que a duração do estímulo produz na HRF, ao mesmo tempo que validou o uso do CW6 em humanos. Nossos resultados mostram que não só a amplitude da resposta hemodinâmica é maior, mas também a região ativada aumenta quando a duração do estímulo aumenta. Estes resultados estão de acordo com medidas previamente publicadas (Hoge *et al.* 2005, Huppert *et al.* 2006b) para as duas situações analisadas com NIRS.

Com o CW6 também analisamos a origem do sinal óptico. A partir de medidas ópticas e de pressão sangüínea durante o repouso, mostramos a influência deste parâmetro fisiológico na composição do sinal óptico. A função resposta determinada no Capítulo 6 reflete o comportamento esperado de um sistema que conecta oscilações de pressão a variações neurofisiológicas. A partir da correlação temporal em diferentes canais, espalhados ao longo de todo o escalpo, mostramos que é possível construir um mapa de correlação óptico. Esta abordagem, original e pioneira com métodos ópticos, sugere fortes correlações espontâneas entre os lados simétricos do cérebro, e que não podem ser atribuídos somente às flutuações fisiológicas. Parece haver, sim, flutuações hemodinâmicas em fase entre as regiões simetricamente opostas nos dois hemisférios durante o estado basal. Este resultado motiva a aplicação da mesma análise durante a ativação funcional, uma vez que as correlações vasculares obtidas estariam refletindo efeitos de conectividade entre as diferentes regiões cerebrais. De forma paralela, os mapas de correlação propostos neste trabalho

poderiam ser aplicados a situações clínicas anormais (como AVC e epilepsia), na tentativa de evidenciar e quantificar as diferenças vasculares causadas por estas patologias. Resultados preliminares em pacientes com AVC revelam uma diminuição significativa da correlação temporal entre os lados simétricos do cérebro.

Na busca por desenvolver uma alternativa mais eficiente para gerar mapas metabólicos a partir de ressonância magnética, realizamos experimentos multimodais envolvendo NIRS e fMRI. Extendendo a idéia de Davis *et al.* (1998), desenvolvemos um método de calibração do sinal BOLD para obter imagens que reflitam o consumo metabólico de oxigênio. Nossa proposta baseou-se na hipótese de que o tempo de trânsito não varia ao longo do cérebro. A constante M foi então determinada a partir da região comum às duas técnicas através de um modelo de otimização. A abordagem foi testada com um experimento de estimulação do nervo mediano, e os resultados obtidos para os parâmetros estimados no modelo estão dentro dos valores encontrados na literatura, enquanto o mapa metabólico criado mostra um aumento no consumo de O_2 na região SI, como esperado em experimentos deste tipo. Experimentos futuros, comparando as grandezas estimadas com aquelas encontradas pelo método padrão em regime de hipercapnia, ou até mesmo com experimentos PET, podem validar a metodologia proposta neste trabalho. Um outro estudo interessante seria utilizar o método de calibração em regime hipercápnic, a fim de determinar a variação da constante M nesta condição, e verificar que de fato a relação isometabólica não se verifica em diferentes níveis de hipercapnia.

Por fim, desenvolvemos ao longo deste trabalho ferramentas computacionais para modelar a resposta hemodinâmica a partir de dados eletrofisiológicos medidos diretamente em animais. Numa primeira abordagem, desenvolvemos um método para a utilização de dados eletrofisiológicos como vínculo no modelo apresentado por Huppert *et al.* (2007b). Mais do que estender o modelo de Windkessel multicompartimental, demos uma base neuronal a este, que pode ser utilizada para o estudo dos acoplamentos neuro-vascular e neuro-metabólico durante a ativação. Ao contrário de metodologias publicadas an-

teriormente, usamos dados eletrofisiológicos, e não parâmetros arbitrários, como vetor de entrada do sistema. Utilizando dados previamente publicados, modelamos respostas hemodinâmicas parametrizadas pela amplitude da deflexão de um fio de bigode de ratos Sprague-Dawley. Os resultados mostram um excelente ajuste dos dados, medidos através da correlação entre as curvas medidas e previstas pelo modelo, com apenas 30% dos graus de liberdade que seriam necessários nos modelos disponíveis na literatura. O vetor de estado estimado nos permite aprender a respeito dos comportamentos neuronal, metabólico e vascular durante o potencial evocado, além das suas inter-relações. A importância deste desenvolvimento refletiu-se no retorno a este trabalho, considerado “Featured Article” pela revista de publicação, além de entrevistas para revistas de divulgação científica inglesas e grants para apresentação dos resultados em importantes conferências internacionais da área. O próximo passo é poder modelar estímulos paramétricos na frequência e duração, onde a forma da curva hemodinâmica muda consideravelmente. Resultados preliminares, também obtidos em ratos, mostram que o modelo apresentado também é capaz de descrever estas respostas, além de permitir entender a função de transferência de cada um destes sistemas. A utilização de medidas eletrofisiológicas alternativas, como os picos P1, N1, P2 em ratos, e dados de EEG ou MEG em humanos, é uma verificação necessária a ser feita no futuro, assim como estudos comparativos com o método descrito no Capítulo 5 em relação à obtenção de $CMRO_2$.

Procurando entender os mecanismos físicos, biológicos e químicos relacionados com o acoplamento neuro-vascular-metabólico, extendemos a idéia desenvolvida via função resposta para o modelo de Aubert and Costalat (2002), que descreve as relações bioquímicas responsáveis pela dilatação arterial e CBF a partir de um potencial de ação. Os resultados, obtidos em conjunto com o laboratório de biofotônica da Universidade de Bogaziçi, mostraram uma concordância entre esta abordagem e a nossa primeira tentativa. A abordagem via um modelo bioquímico também é muito importante, e constitui-se numa ferramenta capaz de fornecer detalhes a respeito das vias de sinalização entre a atividade

neuronal e a resposta hemodinâmica.

Através de todos os experimentos e metodologias citadas acima, acreditamos que tenha sido possível contribuir para um melhor entendimento do acoplamento neuro-vascular-metabólico, além de disponibilizar ferramentas úteis para aplicações clínicas, como o uso de mapas de correlação para o estudo das relações vasculares e a obtenção de mapas metabólicos de consumo de oxigênio.

Apêndice A

Propagação da luz em meios difusivos

Uma possível abordagem que leva em conta a propagação de fótons em um meio denso é a teoria do transporte linear, na qual a luz é tratada como composta por fótons se propagando através de um meio caracterizado pelo seu coeficiente de absorção e espalhamento, e possivelmente contendo regiões discretas de inhomogeneidade. Nesse modelo, apenas as interações entre as partículas de luz e o meio são levadas em conta. Além disso, os efeitos de polarização são desprezados. Apresentamos neste apêndice uma derivação detalhada da equação de transporte radiativa, uma vez que consideramos importante o entendimento do mesmo para o estudo de DOI. Apesar da literatura carecer desta derivação é possível encontrar discussões sucintas a respeito dos princípios do modelo apresentado (Boas *et al.* 2001). Dois excelentes artigos de revisão focando todo o aspecto de reconstrução de tomografia óptica comentam o uso dos principais temas discutidos aqui (Arridge 1999, Gibson *et al.* 2005). Situações análogas encontradas em física, como o problema de transporte de neutrons na atmosfera, também podem auxiliar a compreensão da propagação de fótons em meios turvos (Zamboni 2007).

A.1 A equação de transporte radiativa

Para um meio sem cargas livres, a energia por unidade de tempo, por unidade de área, $\vec{S} = 1/\mu_0(\vec{E} \times \vec{B})$, transportada pelo campo eletromagnético é dada pelo teorema de Poynting:

$$\frac{d}{dt}E = - \oint \vec{S} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A.1})$$

Se definirmos a radiância $L = L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu)$ na posição \vec{r} e no tempo t , na direção $\hat{\Omega}$ com frequência ν , como a quantidade de energia transportada pela radiação de frequências no intervalo $(\nu, \nu + d\nu)$ ao longo de uma superfície da , num tempo dt , dentro de um ângulo sólido $d\Omega$ em torno de $\hat{\Omega}$ (Figura A.1), então podemos escrever

$$dE = L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) da \cos\alpha dt \quad (\text{A.2})$$

de forma que a energia transportada na faixa $(\nu, \nu + d\nu)$ e $(\Omega, \Omega + d\Omega)$ é dada por

$$\delta E d\nu d\Omega = L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) da \cos\alpha dt d\nu d\Omega \quad (\text{A.3})$$

Vemos que se $\hat{\Omega}$ é paralelo a $d\vec{a}$, então $\cos\alpha = 1$.

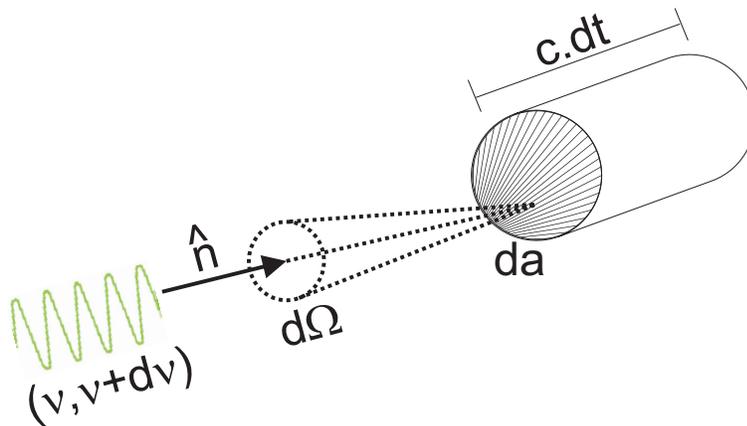


Figura A.1: Representação pictórica do transporte de radiação.

Estabelecidas estas relações, precisamos considerar a interação da radiação com o tecido. Para começar, sabemos que quando a radiação passa através de um material,

parte da energia luminosa é absorvida ou dissipada. Podemos descrever essa perda em termos do coeficiente de extinção $\mu_t(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu)$ do material, definido de forma que um elemento de material de comprimento $d\ell$ e seção de choque $d\vec{a}$ remove uma quantidade de energia

$$dE = \mu_t(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) d\ell da d\Omega d\nu dt \quad (\text{A.4})$$

da radiação.

Já num processo de espalhamento, a direção do movimento de um fóton que interage com o material é alterada ($\hat{\Omega}' \neq \hat{\Omega}$). Nesse caso é conveniente definir um coeficiente de absorção verdadeiro μ_a e um coeficiente de espalhamento μ_s , de forma que o coeficiente de extinção pode ser reescrito como

$$\mu_t(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) = \mu_a(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) + \mu_s(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) \quad (\text{A.5})$$

No entanto, o próprio material pode emitir radiação. Nesse caso, a energia liberada por um meio de comprimento $d\ell$ e seção de choque $d\vec{a}$, num ângulo sólido $d\Omega$ em torno de $\hat{\Omega}$, no intervalo de frequência $d\nu$ num tempo dt é dada por

$$dE = \eta(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) d\ell da d\Omega d\nu dt \quad (\text{A.6})$$

onde η é o coeficiente de emissão do material, e que pode ser separado numa parte térmica η^t e outra parte devido ao espalhamento η^s :

$$\eta(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) = \eta^t(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) + \eta^s(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) \quad (\text{A.7})$$

Assim, considerando um centro espalhador com coeficiente de espalhamento μ_s e fator de fase¹ f , a energia removida do feixe pode ser escrita como

$$\delta E = \mu_s(\vec{r}, t) \int_0^\infty d\nu' \oint d\Omega' f(\vec{r}, t, \nu', \Omega') L(\vec{r}, t, n', \nu') d\ell da dt \quad (\text{A.8})$$

¹Essa grandeza é bastante utilizada em processos de espalhamento, e representa a probabilidade de um fóton na direção Ω ser espalhado na direção Ω'

Partindo da hipótese que re-emissão desta energia é completa, isto é, um fóton ($\hat{\Omega}', \nu'$) é absorvido e imediatamente um fóton ($\hat{\Omega}, \nu$) é emitido, então

$$\eta = \eta^s = \mu_s(\vec{r}, t) \int_0^\infty d\nu' \oint d\Omega' f(\vec{r}, t, \nu', \Omega') L(\vec{r}, t, n', \nu') \quad (\text{A.9})$$

No caso de um espalhamento coerente ($\nu' = \nu$), temos que

$$\eta = \mu_s(\vec{r}, t) \oint d\Omega' f(\Omega, \Omega') L(\vec{r}, t, n', \nu) \quad (\text{A.10})$$

Supondo agora um elemento de material de comprimento $d\ell$ e seção de choque da (Figura A.2), a diferença de energia entre a radiação que atinge esse material e aquela que sai deste pode ser expressa por

$$\delta E_{sai} - \delta E_{entra} = -\delta E_{abs} + \delta E_{emit}$$

$$L(\vec{r} + \Delta\vec{r}, t + \Delta t, \hat{\Omega}, \nu) - L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) = [\eta - \mu_t L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu)] d\ell \quad (\text{A.11})$$

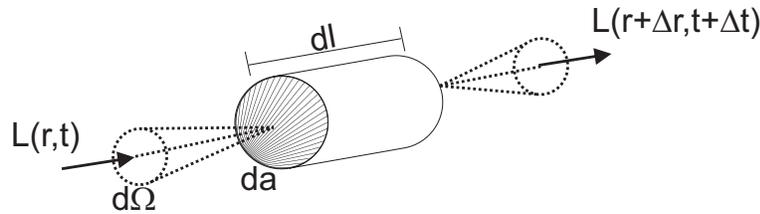


Figura A.2: Representação pictórica do feixe de radiação passando através de um material.

Como $\Delta t = \frac{d\ell}{v}$, tomando o limite em que Δt e $\Delta\ell$ vão a zero, teremos

$$L(\vec{r} + \Delta\vec{r}, t + \Delta t, \hat{\Omega}, \nu) - L(\vec{r}, t, \hat{\Omega}, \nu) = \frac{1}{v} \frac{\partial L}{\partial t} d\ell + \frac{\partial L}{\partial \ell} d\ell \quad (\text{A.12})$$

Logo, comparando as equações A.11 e A.12, vemos que

$$\frac{1}{v} \frac{\partial L}{\partial t} + \frac{\partial L}{\partial \ell} = \eta - \mu_t L \quad (\text{A.13})$$

Ainda é possível mostrar que $\frac{\partial L}{\partial t} = \hat{\Omega} \cdot \vec{\nabla} L$, de forma que a equação acima pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial L}{\partial t} + \hat{\Omega} \cdot \vec{\nabla} L + \mu_t L = \eta$$

Substituindo a equação A.10 na equação acima, e acrescentando fontes externas de energia no sistema, $Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t)$, de forma que a equação acima possa ser expressa numa forma mais geral, chegamos a:

$$\left[\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \hat{\Omega} + \mu_t \right] L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \mu_s \oint f(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}') L(\vec{r}, \hat{\Omega}', t) d\hat{\Omega}' + Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t), \quad (\text{A.14})$$

que é conhecida como Equação de Transporte Radiativa (RTE).

A.2 Solução da equação de transporte radiativa: a aproximação P_N

Uma das formas de contornar a dificuldade de encontrar soluções analíticas da equação de transporte é considerar soluções aproximadas para a equação A.14. Um destes métodos é a chamada aproximação P_N , que consiste em expandir a radiância, a função de fase e o termo de fonte em esféricos harmônicos $Y_l^m(\hat{\Omega})$ e truncar a série em $l = N$:

$$L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \phi_{l,m}(\vec{r}, t) Y_l^m(\hat{\Omega}) \quad (\text{A.15})$$

$$Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l q_{l,m}(\vec{r}, t) Y_l^m(\hat{\Omega}) \quad (\text{A.16})$$

Se considerarmos que a função de fase é independente do ângulo absoluto, então $f = f(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}') = f(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$. Logo, podemos expandir essa função como

$$\begin{aligned} f(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}') &= \sum_{l=0}^N \frac{2l+1}{4\pi} g_l P_l(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}') \\ &= \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l g_l Y_l^{m*}(\hat{\Omega}') Y_l^m(\hat{\Omega}) \end{aligned} \quad (\text{A.17})$$

onde a função de fase é normalizada de forma que $g_0 = 1$ e $g_1 = \langle \cos\theta \rangle$. Substituindo as expansões na equação de transporte radiativa, eq. A.14, temos

$$\sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \left\{ \left[\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{\Omega} \cdot \vec{\nabla} + \mu_t \right] \phi_{l,m} Y_l^m - q_{l,m} Y_l^m - \underbrace{-\mu_s \int d\hat{\Omega}' \phi_{l,m} Y_l^m(\hat{\Omega}') \sum_{l'=0}^{\infty} \sum_{m'=-l}^l g_{l'} Y_{l'}^{m'*}(\hat{\Omega}') Y_l^m(\hat{\Omega})}_{\equiv I_1} \right\} = 0 \quad (\text{A.18})$$

Podemos utilizar a relação de ortonormalidade dos harmônicos esféricos para calcular a integral I_1 :

$$\begin{aligned} I_1 &= \sum_{l'=0}^{\infty} \sum_{m'=-l}^l g_{l'} Y_l^m(\Omega) \phi_{l,m} \int d\hat{\Omega}' Y_l^m(\hat{\Omega}') Y_{l'}^{m'*}(\hat{\Omega}') \\ &= \phi_{l,m} g_l Y_l^m(\Omega) \end{aligned} \quad (\text{A.19})$$

Assim, temos que

$$\sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \left\{ \left[\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{\Omega} \cdot \vec{\nabla} + \mu_t \right] \phi_{l,m} - q_{l,m} - \mu_s \phi_{l,m} g_l \right\} Y_l^m(\Omega) = 0 \quad (\text{A.20})$$

Definindo

$$\mu_t^{(l)} \equiv \mu_t - \mu_s g_l = \mu_s(1 - g_l) + \mu_a \quad (\text{A.21})$$

podemos reescrever a equação A.20 como

$$\sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \left\{ \left[\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{\Omega} \cdot \vec{\nabla} + \mu_t^{(l)} \right] \phi_{l,m} - q_{l,m} \right\} Y_l^m(\Omega) = 0 \quad (\text{A.22})$$

Multiplicando toda a equação por $Y_\alpha^{\beta*}$ e integrando sobre $\hat{\Omega}$, chegamos a

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{\alpha,\beta}}{\partial t} + \mu_t^{(\alpha)} \phi_{\alpha,\beta} + \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \int d\hat{\Omega} \left(\hat{\Omega} Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \right) \cdot \vec{\nabla} \phi_{l,m} Y_l^m(\Omega) = q_{\alpha,\beta} \quad (\text{A.23})$$

Precisamos calcular a integral agora. Primeiramente, vemos que

$$\begin{aligned} \hat{\Omega} Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) &= \Omega_x Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{x} + \Omega_y Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{y} + \Omega_z Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{z} \\ &= \sin\theta \cos\varphi Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{x} + \sin\theta \sin\varphi Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{y} + \cos\theta Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \hat{z} \end{aligned} \quad (\text{A.24})$$

Sabendo que (Arfken and Weber 2001)

$$\begin{aligned}\cos \theta Y_l^m &= \sqrt{\frac{(l-m+1)(l+m+1)}{(2l+1)(2l+3)}} Y_{l+1}^m + \sqrt{\frac{(l-m)(l+m)}{(2l+1)(2l-1)}} Y_{l-1}^m \\ e^{i\varphi} \sin \theta Y_l^m &= -\sqrt{\frac{(l+m+1)(l+m+2)}{(2l+1)(2l+3)}} Y_{l+1}^{m+1} + \sqrt{\frac{(l-m)(l-m-1)}{(2l-1)(2l+1)}} Y_{l-1}^{m+1} \\ e^{-i\varphi} \sin \theta Y_l^m &= \sqrt{\frac{(l-m+1)(l-m+2)}{(2l+1)(2l+3)}} Y_{l+1}^{m-1} - \sqrt{\frac{(l+m)(l+m-1)}{(2l-1)(2l+1)}} Y_{l-1}^{m-1}\end{aligned}$$

é possível calcular todos os termos em [A.24](#) e, conseqüentemente, a integral em [A.23](#).

Para a componente z , por exemplo,

$$\begin{aligned}\left[\int d\hat{\Omega} \left(\hat{\Omega} Y_\alpha^{\beta*}(\Omega) \right) \cdot \vec{\nabla} \phi_{l,m} Y_l^m(\Omega) \right]_z &= \int d\hat{\Omega} \Omega_z Y_\alpha^{\beta*} \cdot \vec{\nabla}_z \phi_{l,m} Y_l^m \\ &= \int d\hat{\Omega} \left[\sqrt{\frac{(\alpha-\beta+1)(\alpha+\beta+1)}{(2\alpha+1)(2\alpha+3)}} \frac{\partial \phi_{l,m}}{\partial z} Y_{\alpha+1}^{\beta*} Y_l^m + \right. \\ &\quad \left. + \sqrt{\frac{(\alpha-\beta)(\alpha+\beta)}{(2\alpha+1)(2\alpha-1)}} \frac{\partial \phi_{l,m}}{\partial z} Y_{\alpha-1}^{\beta*} Y_l^m \right] \\ &= \sqrt{\frac{(\alpha-\beta+1)(\alpha+\beta+1)}{(2\alpha+1)(2\alpha+3)}} \frac{\partial \phi_{l,m}}{\partial z} \delta_{l,\alpha+1} \delta_{m,\beta} + \\ &\quad + \sqrt{\frac{(\alpha-\beta)(\alpha+\beta)}{(2\alpha+1)(2\alpha-1)}} \frac{\partial \phi_{l,m}}{\partial z} \delta_{l,\alpha-1} \delta_{m,\beta} \quad (\text{A.25})\end{aligned}$$

Usando o mesmo raciocínio para as componentes x e y , podemos substituir as expressões encontradas na equação [A.23](#), de forma que a equação de transporte [A.14](#) pode

ser reescrita como

$$\begin{aligned}
& \frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{\alpha,\beta}}{\partial t} + \mu_t^{(\alpha)} \phi_{\alpha,\beta} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{(\alpha + \beta + 1)(\alpha + \beta + 2)}{(2\alpha + 1)(2\alpha + 3)}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{\alpha+1,\beta+1} + \\
& + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{(\alpha - \beta - 1)(\alpha - \beta)}{(2\alpha + 1)(2\alpha - 1)}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{\alpha-1,\beta+1} + \\
& + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{(\alpha - \beta + 1)(\alpha - \beta + 2)}{(2\alpha + 1)(2\alpha + 3)}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{\alpha+1,\beta-1} - \\
& - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{(\alpha + \beta)(\alpha + \beta - 1)}{(2\alpha + 1)(2\alpha - 1)}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{\alpha-1,\beta-1} + \\
& + \sqrt{\frac{(\alpha - \beta + 1)(\alpha + \beta + 1)}{(2\alpha + 1)(2\alpha + 3)}} \frac{\partial \phi_{\alpha+1,\beta}}{\partial z} + \sqrt{\frac{(\alpha - \beta)(\alpha + \beta)}{(2\alpha - 1)(2\alpha + 1)}} \frac{\partial \phi_{\alpha-1,\beta}}{\partial z} = q_{\alpha,\beta} \quad (\text{A.26})
\end{aligned}$$

que representa $(N + 1)^2$ equações diferenciais parciais acopladas para $\phi_{\alpha,\beta}$. Quanto maior for N , maior é a precisão do modelo em relação à solução analítica da equação de transporte.

A.3 A aproximação P_1 : equação de difusão de fótons

Tomando apenas o primeiro termo da expansão, temos um sistema com 4 equações: $\alpha = 0, \beta = 0$ e $\alpha = 0, \beta = 0, \pm 1$. Para a primeira é fácil notar que

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{0,0}}{\partial t} + \mu_t^{(0)} \phi_{0,0} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{1,1} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{1,-1} + \sqrt{\frac{1}{3}} \frac{\partial \phi_{1,0}}{\partial z} = q_{0,0}$$

Mas, de acordo com a equação A.21, $\mu_t^{(0)} = \mu_a$. Assim,

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{0,0}}{\partial t} + \mu_a \phi_{0,0} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{1,1} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{1,-1} + \sqrt{\frac{1}{3}} \frac{\partial \phi_{1,0}}{\partial z} = q_{0,0} \quad (\text{A.27})$$

Para $\alpha = 1, \beta = 0$ temos

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{1,0}}{\partial t} + \mu_t^{(1)} \phi_{1,0} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{6}{15}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{2,1} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{6}{15}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{2,-1} + \sqrt{\frac{1}{3}} \frac{\partial \phi_{0,0}}{\partial z} = q_{1,0}$$

Se levarmos em conta apenas termos de até $N = 1$, podemos reescrever a expressão acima como

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{1,0}}{\partial t} + \mu_t^{(1)} \phi_{1,0} + \sqrt{\frac{1}{3}} \frac{\partial \phi_{0,0}}{\partial z} = q_{1,0} \quad (\text{A.28})$$

Analogamente, para $\alpha = 1$, $\beta = \pm 1$ é possível mostrar que

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \phi_{1,\pm 1}}{\partial t} + \mu_t^{(1)} \phi_{1,\pm 1} \mp \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} \mp i \frac{\partial}{\partial y} \right) \phi_{0,0} = q_{1,\pm 1} \quad (\text{A.29})$$

Por outro lado, se considerarmos a taxa de fluência de fótons

$$\Phi(\vec{r}, t) = \int d\hat{\Omega} L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \quad (\text{A.30})$$

e o fluxo dos mesmos (ou densidade de corrente de fótons)

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = \int d\hat{\Omega} L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \hat{\Omega} \quad (\text{A.31})$$

podemos então escrever $\phi_{\alpha,\beta}$ em termos destas grandezas, pois

$$\begin{aligned} \Phi &= \int d\hat{\Omega} L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \phi_{l,m} \int d\hat{\Omega} Y_l^m(\hat{\Omega}) \\ &= \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \sqrt{4\pi} \phi_{l,m} \int d\hat{\Omega} Y_l^m(\hat{\Omega}) Y_0^{0*}(\hat{\Omega}) \\ &= \sqrt{4\pi} \phi_{0,0} \end{aligned} \quad (\text{A.32})$$

e

$$\begin{aligned} \vec{J}(\vec{r}, t) &= \int d\hat{\Omega} L(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) \hat{\Omega} \\ &= \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \phi_{l,m} \int d\hat{\Omega} (\sin \theta \cos \varphi \hat{x} + \sin \theta \sin \varphi \hat{y} + \cos \theta \hat{z}) Y_l^m(\hat{\Omega}) \end{aligned}$$

Como $Y_1^{1*} = -\sqrt{\frac{3}{8\pi}} \sin \theta e^{-i\varphi}$, $Y_1^{-1*} = \sqrt{\frac{3}{8\pi}} \sin \theta e^{i\varphi}$ e $Y_1^{0*} = \sqrt{\frac{3}{4\pi}} \cos \theta$, podemos escrever os termos de θ e φ em termos dos harmônicos esféricos Y_1^{-1*} , Y_1^{1*} e Y_1^{0*} , de forma

que

$$\begin{aligned}
\vec{J}(\vec{r}, t) &= \sum_{l=0}^N \sum_{m=-l}^l \sqrt{\frac{4\pi}{3}} \phi_{l,m} \int d\hat{\Omega} \left[\frac{1}{\sqrt{2}} \left(Y_1^{-1*}(\hat{\Omega}) - Y_1^{1*}(\hat{\Omega}) \right) \hat{x} - \right. \\
&\quad \left. - \frac{i}{\sqrt{2}} \left(Y_1^{-1*}(\hat{\Omega}) + Y_1^{1*}(\hat{\Omega}) \right) \hat{y} + Y_1^{0*}(\hat{\Omega}) \hat{z} \right] Y_l^m(\hat{\Omega}) \\
&= \sqrt{\frac{4\pi}{3}} \left[\frac{1}{\sqrt{2}} (\phi_{1,-1} - \phi_{1,1}) \hat{x} - \frac{i}{\sqrt{2}} (\phi_{1,-1} + \phi_{1,1}) \hat{y} + \phi_{1,0} \hat{z} \right] \quad (\text{A.33})
\end{aligned}$$

A partir daí, temos que:

$$J_x = \sqrt{\frac{2\pi}{3}} (\phi_{1,-1} - \phi_{1,1}) \quad (\text{A.34})$$

$$J_y = -i\sqrt{\frac{2\pi}{3}} (\phi_{1,-1} + \phi_{1,1}) \quad (\text{A.35})$$

$$J_z = \sqrt{\frac{4\pi}{3}} \phi_{1,0} \quad (\text{A.36})$$

Assim, substituindo as expressões encontradas para Φ e \vec{J} em A.27 encontramos

$$\begin{aligned}
\frac{1}{v} \frac{1}{\sqrt{4\pi}} \frac{\partial \Phi}{\partial t} + \frac{1}{\sqrt{4\pi}} \mu_a \Phi + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y} \right) \sqrt{\frac{3}{8\pi}} (J_x - iJ_y) + \\
+ \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2}{3}} \left(\frac{\partial}{\partial x} - i \frac{\partial}{\partial y} \right) \sqrt{\frac{3}{8\pi}} (J_x + iJ_y) + \sqrt{\frac{1}{3}} \sqrt{\frac{3}{4\pi}} \frac{\partial J_z}{\partial z} = q_{0,0} \\
\frac{1}{v} \frac{\partial \Phi}{\partial t} + \mu_a \Phi + \vec{\nabla} \cdot \vec{J} = \sqrt{4\pi} q_{0,0} \quad (\text{A.37})
\end{aligned}$$

Se considerarmos a fonte de fótons como constituída por um momento de monopolo e outro de dipolo,

$$Q(\vec{r}, \hat{\Omega}, t) = \frac{1}{4\pi} Q_0(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{Q}_1(\vec{r}, t) \cdot \hat{\Omega}$$

e compararmos o primeiro termo da série de Q , $q_{0,0} Y_0^0$, vemos que $q_{0,0} = \frac{1}{\sqrt{4\pi}} Q_0$. Para o segundo termo da série,

$$\frac{3}{4\pi} [Q_{1x} \sin \theta \cos \varphi + Q_{1y} \sin \theta \sin \varphi + Q_{1z} \cos \theta] = q_{1,0} Y_1^0 + q_{1,-1} Y_1^{-1} + q_{1,1} Y_1^1$$

o que implica em

$$q_{1,0} = \sqrt{\frac{3}{4\pi}} Q_{1z} \quad (\text{A.38})$$

$$q_{1,-1} = \sqrt{\frac{3}{8\pi}} (Q_{1x} + iQ_{1y}) \quad (\text{A.39})$$

$$q_{1,1} = \sqrt{\frac{3}{8\pi}} (-Q_{1x} + iQ_{1y}) \quad (\text{A.40})$$

Assim, a expressão para $\alpha = 0, \beta = 0$ (eq. A.37) pode ser finalmente reescrita

$$\frac{1}{v} \frac{\partial \Phi}{\partial t} + \mu_a \Phi + \vec{\nabla} \cdot \vec{J} = Q_0 \quad (\text{A.41})$$

Analogamente, substituindo as expressões encontradas para Φ e \vec{J} em A.28, e levando em consideração A.38, temos

$$\frac{1}{v} \frac{\partial J_z}{\partial t} + \mu_t^{(1)} J_z + \frac{1}{3} \frac{\partial \Phi}{\partial z} = Q_{1z} \quad (\text{A.42})$$

Para $\alpha = 1, \beta = \pm 1$ encontraremos, a partir de A.29,

$$\mp \frac{1}{v} \frac{\partial J_x}{\partial t} + \frac{i}{v} \frac{\partial J_y}{\partial t} \mp \mu_t^{(1)} J_x + i \mu_t^{(1)} J_y \mp \frac{1}{3} \frac{\partial \Phi}{\partial x} + \frac{i}{3} \frac{\partial \Phi}{\partial y} = \mp Q_{1x} + i Q_{1y} \quad (\text{A.43})$$

Isolando as variáveis x e y na equação A.43 chegamos a

$$\frac{1}{v} \frac{\partial J_y}{\partial t} + \mu_t^{(1)} J_y + \frac{1}{3} \frac{\partial \Phi}{\partial y} = Q_{1y} \quad (\text{A.44})$$

$$\frac{1}{v} \frac{\partial J_x}{\partial t} + \mu_t^{(1)} J_x + \frac{1}{3} \frac{\partial \Phi}{\partial x} = Q_{1x} \quad (\text{A.45})$$

Assim, o sistema de equações diferenciais parciais a serem resolvidas para $N = 1$ pode ser resumido como

$$\begin{cases} \frac{1}{v} \frac{\partial \Phi}{\partial t} + \mu_a \Phi + \vec{\nabla} \cdot \vec{J} = Q_0 \\ \frac{1}{v} \frac{\partial \vec{J}}{\partial t} + \mu_t^{(1)} \vec{J} + \frac{1}{3} \vec{\nabla} \Phi = \vec{Q}_1 \end{cases} \quad (\text{A.46})$$

Isolando o divergente de \vec{J} na primeira equação, e substituindo esta no divergente da segunda equação obtemos

$$\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} \left[Q_0 - \frac{1}{v} \frac{\partial \Phi}{\partial t} - \mu_a \Phi \right] + (\mu'_s + \mu_a) \left[Q_0 - \frac{1}{v} \frac{\partial \Phi}{\partial t} - \mu_a \Phi \right] + \frac{1}{3} \nabla^2 \Phi = \vec{\nabla} \cdot \vec{Q}_1$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{3}\nabla^2\Phi + \frac{1}{v}\frac{\partial Q_0}{\partial t} - \frac{1}{v^2}\frac{\partial^2\Phi}{\partial t^2} - \frac{\mu_a}{v}\frac{\partial\Phi}{\partial t} + \mu'_s Q_0 - \frac{\mu'_s}{v}\frac{\partial\Phi}{\partial t} \\ - \mu'_s \mu_a \Phi + \mu_a Q_0 - \mu_a^2 \Phi - \frac{\mu_a}{v}\frac{\partial\Phi}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot \vec{Q}_1 \end{aligned}$$

No entanto, se $\mu_a \ll \mu'_s$ então $\mu_a Q_0, \mu_a^2 \Phi \rightarrow 0$. Multiplicando a equação por $-v/\mu'_s$, temos

$$\frac{-v}{3\mu'_s}\nabla^2\Phi + v\mu_a\Phi + \frac{\partial\Phi}{\partial t} + 2\frac{\mu_a}{\mu'_s}\frac{\partial\Phi}{\partial t} + \frac{1}{v\mu'_s}\frac{\partial^2\Phi}{\partial t^2} = vQ_0 + \frac{1}{\mu'_s}\frac{\partial Q_0}{\partial t} - \frac{v}{\mu'_s}\vec{\nabla} \cdot \vec{Q}_1$$

Definindo $D \equiv \frac{v}{3\mu'_s}$ como o coeficiente de difusão dos fótons no meio, chegamos a

$$-D\nabla^2\Phi + v\mu_a\Phi + \frac{\partial\Phi}{\partial t} + \frac{3D}{v}\left[2\mu_a\frac{\partial\Phi}{\partial t} + \frac{1}{v}\frac{\partial^2\Phi}{\partial t^2}\right] = vQ_0 + \frac{3D}{v}\frac{\partial Q_0}{\partial t} - 3D\vec{\nabla} \cdot \vec{Q}_1 \quad (\text{A.47})$$

Por fim, se assumirmos a fonte como isotrópica, o termo de momento de dipolo vai a zero. Por outro lado, se a intensidade da fonte é modulada de forma senoidal, a fluência também passa a ser modulada da mesma forma, e todas as derivadas temporais relacionadas com Q e Φ podem ser substituídas por $-i\omega$. Conseqüentemente, estes termos podem ser ignorados quando $3D\omega/v^2 \ll 1$. Esta hipótese é equivalente a fazer $v\mu'_s/\omega \gg 1$, ie, considerar a frequência de espalhamento muito maior do que a frequência de modulação. Assim, fazendo estas aproximações chegamos a

$$-D(\vec{r})\nabla^2\Phi(\vec{r}, t) + v\mu_a(\vec{r})\Phi(\vec{r}, t) + \frac{\partial}{\partial t}\Phi(\vec{r}, t) = vQ_0(\vec{r}, t) \quad (\text{A.48})$$

que é a chamada equação de difusão de fótons, uma solução aproximada da equação de transporte radiativa quando a probabilidade de espalhamento de um fóton dentro de um determinado meio é muito maior do que a probabilidade de absorção deste. Também assumimos que a função de fase é independente do ângulo absoluto, o fluxo de fótons varia lentamente e todas as fontes são isotrópicas.

Apêndice B

Algoritmos Computacionais

B.1 O problema de otimização não-linear

Sucintamente, o problema de otimização se resume a encontrar um vetor \mathbf{x}^* que é um minimizador local para uma função $f(\mathbf{x})$, possivelmente sujeito a vínculos:

$$\begin{aligned} \text{Min} \quad & f(\mathbf{x}) \\ \text{s.a.} \quad & A \cdot \mathbf{x} \leq b \\ & W \cdot \mathbf{x} = c \end{aligned} \tag{B.1}$$

onde $f : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ é a função custo a ser minimizada, $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n$ é o vetor de estado, que contém os parâmetros a serem minimizados, e \mathbf{x}^* é o vetor ótimo que minimiza F . Os vínculos de igualdade e desigualdade do problema são representados por $W \in \mathbb{R}^{p \times n}$, $c \in \mathbb{R}^p$, e $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$, $b \in \mathbb{R}^m$ ($m, p < n$), respectivamente, e delimitam a região factível $S \subset \mathbb{R}^n$ onde o vetor ótimo pode ser encontrado.

Em nosso caso, a função custo escolhida foi a de quadrados mínimos ponderados, que penaliza a divergência entre os observáveis medidos e os preditos de acordo com a incerteza da medida:

$$f(\mathbf{x}) = \sum_i \sum_{t=1}^N \frac{\left(Y_{meas}^{(i,t)} - Y_{pred}^{(i,t)} \right)^2}{R_{i,t}} \tag{B.2}$$

onde Y^i representa o i -ésimo observável, e R_i a sua variância em cada instante de tempo t . Os observáveis estimados Y_{pred} são calculados através do conjunto de equações que representam o modelo considerado (modelo direto), e o processo de otimização constitui-se no modelo inverso. Para a atualização do vetor de estado, foi considerado o cálculo da direção de descida a cada iteração k , d_k , proporcional a $-\nabla f$, a fim de gerar uma seqüência x_k que convirga a x^* .

A implementação do formalismo acima foi feita utilizando o método não-linear de Levenberg-Marquardt disponível em Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA, EUA, versão 7.0), que utiliza como direção de descida a solução do sistema linear de equações:

$$(J(x_k)^T J(x_k) + \lambda_k I) d_k = -J(x_k)^T f(x_k) \quad (\text{B.3})$$

onde $J(x_k)$ representa o jacobiano de $f(x_k)$. O escalar λ_k é determinado através de busca linear e controla a amplitude e direção de d_k ¹.

A rotina de ajuste foi iterada até o critério de convergência ser atingido ($f_k/f_{k-1} < 10^{-8}$). Para a atualização das variáveis de estado, o passo temporal diferencial dt foi definido como 1 ms, e todos os valores dos observáveis medidos foram interpolados nessa taxa de repetição.

B.2 Simulações de Monte Carlo com Cadeias de Markov

A fim de testar o intervalo de confiança do vetor de estado ótimo produzido na seção anterior e estimar a variância dos parâmetros de ajuste, realizamos simulações de Monte Carlo com cadeias de Markov no espaço de estados dos parâmetros, e com isso estimamos os intervalos de confiança com nível de significância de 5%.

Sucintamente, métodos de Monte Carlo são métodos numéricos que utilizam amostragem aleatória a fim de realizar simulações estatísticas. Por outro lado, uma cadeia de

¹Quando $\lambda_k = 0$, a direção de descida é equivalente a menos o valor do gradiente no ponto x_k , i.e., $d_k = -\nabla f(x_k)$.

Markov é um modelo matemático para sistemas estocásticos cujos estados, discretos ou contínuos, são governados por uma probabilidade de transição. Numa cadeia de Markov, o estado atual depende apenas dos estados anteriores mais recentes:

$$x_t | x_{t-1}, \dots, x_0 \approx P(x_t | x_{t-1}, \dots, x_0) \quad (\text{B.4})$$

A idéia das simulações de Monte Carlo com Cadeias de Markov (MCMC) é realizar uma simulação de Monte Carlo com amostragem dada por uma cadeia de Markov. Assim, Para um estado inicial n -dimensional $\mathbf{x}_0 \in \mathbb{R}^n$, utilizamos o processo de Markov para amostrar novos estados \mathbf{x}_t , que serão utilizados numa simulação de Monte Carlo.

Neste trabalho, realizamos 30 iterações a partir do vetor de estado inicial, com probabilidade de transição uniforme e aleatória. Em cada iteração, utilizamos a variação do valor de χ^2 para determinar a probabilidade de aceitação de cada passo, que foi definida como (Carter and Kohn 1996):

$$P(k | \{j < k\}) = \begin{cases} 1 & , \text{ se } \Delta\chi^2 \leq 1 \\ e^{-\Delta\chi^2} & , \text{ caso contrário} \end{cases} \quad (\text{B.5})$$

onde k representa a iteração analisada, e $\{j < k\}$ é o conjunto de todos os passos anteriores. A densidade de amostras aproxima a função densidade de probabilidade n -dimensional (n é o número de graus de liberdade do sistema), e a partir daí é possível calcular os intervalos de confiança para cada estado estimado.

Referências Bibliográficas

- Arai T., Mori K., Nakao S., Watanabe K., Kito K., Aoki M., Mori H., Morikawa S. and Inubushi T. (1991), *In vivo oxygen-17 nuclear magnetic resonance for the estimation of cerebral blood flow and oxygen consumption*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **179**, 954-61.
- Arfken G.B. and Weber H.J. (2001), *Mathematical methods for physicists*, 5th ed., Academic Press, San Diego.
- Arienzo D., Babiloni C., Ferretti A., Caulo M., Del Gratta C., Tartaro A., Rossini P.M. and Romani G.L. (2006), *Somatotopy of anterior cingulate cortex (ACC) and supplementary motor area (SMA) for electric stimulation of the median and tibial nerves: an fMRI study*, Neuroimage **33**, 700-5.
- Arridge S.R. (1999), *Optical tomography in medical imaging*, Inverse Problems **15**, R41-93.
- Arridge S.R., Dehghani H., Schweiger M. and Okada E. (2000), *The finite element model for the propagation of light in scattering media: a direct method for domains with nonscattering regions*, Med. Phys. **27**, 252-64.
- Atlas of Anatomy*, Taj Books Ltd, Beijing (2007).
- Aubert A., Costalat R. and Valabrègue R. (2001), *Modeling of the coupling between brain electrical activity and metabolism*, Acta Biotheoretica **49**, 301-26.

- Aubert A. and Costalat R. (2002), *A model of the coupling between brain electrical activity, metabolism and hemodynamics: application to the interpretation of functional neuroimaging*, Neuroimage **17**, 1162-81.
- Boas D.A., Brooks D.H., Miller E.L., DiMarzio C.A., Kilmer M., Gaudette R.J. and Zhang Q. (2001), *Imaging the body with diffuse optical tomography*, IEEE Sign. Proc. Mag. November, 57-75.
- Boas D.A., Culver J.P., Stott J.J. and Dunn A.K. (2002), *Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head*, Opt. Expr. **10**, 159-70.
- Boas D.A., Strangman G., Culver J.P., Hoge R.D., Jaszewski G., Poldrack R.A., Rosen B.R. and Mandeville J.B. (2003), *Can the cerebral metabolic rate of oxygen be estimated with near-infrared spectroscopy?*, Phys. Med. Biol. **48**, 2405-18.
- Boas D.A., Dale A.M. and Franceschini M.A. (2004a), *Diffuse optical imaging of brain activation: approaches to optimizing image sensitivity, resolution, and accuracy*, Neuroimage **23**, S275-88.
- Boas D.A., Chen K., Grebert D. and Franceschini M.A. (2004b), *Improving the diffuse optical imaging spatial resolution of the cerebral hemodynamic response to brain activation in humans*, Opt. Lett. **29**, 1506-8.
- Boas D.A. and Dale A.M. (2005), *Simulation study of magnetic resonance imaging-guided cortically constrained diffuse optical tomography of human brain function*, App. Opt. **44(10)**, 1957-68.
- Buckner R.L. and Vincent J.L. (2007), *Unrest at rest: default activity and spontaneous network correlations*, Neuroimage **37**, 1091-6.

- Buxton R.B. and Frank L.R. (1997), *A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **17**, 64-72.
- Buxton R.B., Wong E.C. and Frank L.R. (1998), *Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model*, Magn. Reson. Med. **39**, 855-64.
- Buxton R.B. (2002), *Introduction to functional magnetic resonance imaging: principles and techniques*, 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Buxton R.B., Uludag K., Dubowitz D.J. and Liu T.T. (2004), *Modeling of the hemodynamic response to brain activation*, Neuroimage **23**, S220-33.
- Carter C.K. and Kohn R. (1996), *Markov Chain Monte Carlo in conditionally Gaussian state space models*, Biometrika **83**, 589-601.
- Chiarelli P.A., Bulte D.P., Piechnik S. and Jezzard P. (2007), *Sources of systematic bias in hypercapnia-calibrated functional MRI estimation of oxygen metabolism*, Neuroimage **34**, 35-43.
- Cohen-Adad J., Chapuisat S., Doyon J., Rossignol S., Lina J.M., Benali H. and Lesage F. (2007), *Activation detection in diffuse optical imaging by means of the general linear model*, Med. Img. Analys. **11**, 616-29.
- Cope M. and Delpy D.T. (1988), *System for long-term measurement of cerebral blood flow and tissue oxygenation on newborn infants by infrared transillumination*, Med. Biol. Eng. Comput. **26**, 289-94.
- Cox R.W. (1996), *AFNI: software for analysis and visualization of functional magnetic resonance neuroimages*, Comp. Biom. Res. **29**, 162-73.
- Cox R.W. and Hyde J.S. (1999), *Software tools for analysis and visualization of fMRI data*, NMR Biom. **10**, 171-8.

- Custo A. (2008), *Purely optical tomography: atlas-based reconstruction of brain activation*, PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA, EUA).
- Custo A., Mesquita R.C., Dan P., Tsuzuki D., Fischl B., Wells W.M. and Boas D.A. (submitted), *Anatomical atlas-guided diffuse optical tomography of brain activation*, Opt. Expr.
- Cutler M. (1929), *Transillumination of the breast*, Surg. Gynecol. Obstet. **48**, 721-7.
- Davis T.L., Kwong K.K., Weisskoff R.M. and Rosen B.R. (1998), *Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 1834-9.
- Devor A., Dunn A.K., Andermann M.L., Ulbert I., Boas D.A. and Dale A.M. (2003), *Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex*, Neuron **39**, 353-9.
- Devor A., Ulbert I., Dunn A.K., Narayanan S.N., Jones S.R., Andermann M.L., Boas D.A. and Dale A.M. (2005), *Coupling of the cortical hemodynamic response to cortical and thalamic neuronal activity*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102(10)**, 3822-7.
- Devor A., Tian P., Nishimura N., Teng I.C., Hillman E.M.C., Narayanan S.N., Ulbert I., Boas D.A., Kleinfeld D. and Dale A.M. (2007), *Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal*, J. Neuroscience **27**, 4452-9.
- Diamond S.G., Huppert T.J., Kolehmainen V., Franceschini M.A., Kaipio J.P., Arridge S.R. and Boas D.A. (2006), *Dynamic physiological modeling for functional diffuse optical tomography*, Neuroimage **30**, 88-101.

- Dienel G.A. (2002), *Energy Generation in the Central Nervous System*. In: Edvinsson L, Krause DN, editors. *Cerebral Blood Flow and Metabolism*: Lippincott Williams and Wilkins.
- Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A. and Boas D.A. (2001), *Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle*, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 195-201.
- Dunn A.K., Devor A., Dale A.M. and Boas D.A. (2005), *Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex*, *Neuroimage* **27**, 279-90.
- Duvernoy H.M., Delon S. and Vannson J.L. (1981), *Cortical blood vessels of the human brain*, *Brain Res. Bull.* **7**, 519-79.
- Ferretti A., Babiloni C., Arienzo D., Del Gratta C., Rossini P.M., Tartaro A. and Romani G.L. (2007), *Cortical brain responses during passive nonpainful median nerve stimulation at low frequencies (0.5-4 Hz): an fMRI study*, *Hum. Brain Mapp.* **28**, 645-53.
- Fox P.T. and Raichle M.E. (1986), *Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1140-4.
- Fox P.T., Raichle M.E., Mintun M.A. and Dence C. (1988), *Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity*, *Science* **241**, 462-4.
- Franceschini M.A., Joseph D.K., Huppert T.J., Diamond S.G. and Boas D.A. (2006), *Diffuse optical imaging of the whole head*, *J. Biomed. Optics* **11**, 054007.
- Franceschini M.A., Nissilä I., Wu W., Diamond S.G., Bonmassar G. and Boas D.A. (2008), *Coupling between somatosensory evoked potentials and hemodynamic response in the rat*, *Neuroimage* **41**, 189-203.

- Friston K.J., Mechelli A., Turner R. and Price C.J. (2000), *Nonlinear responses in fMRI: the balloon model, Volterra kernels, and other hemodynamics*, Neuroimage **12**, 466-77.
- Furutsu K. (1980), *Diffusion equation derived from the space-time transport equation*, J. Opt. Soc. Am. **70**, 360-6.
- Gibson A.P., Hebden J.C. and Arridge S.R. (2005), *Recent advances in diffuse optical imaging*, Phys. Med. Biol. **50**, R1-43.
- Ginsberg M.D., Chang J.Y., Kelly R.E., Yoshii F., Barker W.W., Ingenito G. and Boothe T.E. (1988), *Increases in both cerebral glucose utilization and blood flow during execution of a somatosensory task*, Ann. Neurol. **23**, 152-60.
- Graaff R. and Rinzema K. (2001), *Practical improvements on photon diffusion theory: application to isotropic scattering*, Phys. Med. Biol. **46**, 3043-50.
- Greicius M.D., Krasnow B., Reiss A.L. and Menon V. (2003), *Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 253-8.
- Groenhuis R.A., Ferwerda J. and Ten Bosch H.A. (1983), *Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements: I. Theory*, App. Opt. **22**, 2463-7.
- Grubb R.L., Raichle M.E., Eichling J.O. and Ter-Pogossian M.M. (1974), *The effects of changes in PaCO₂ cerebral blood volume, blood flow and vascular mean transit time*, Stroke **5**, 630-9.
- Habler O.P. and Messmer K.F. (1997), *The physiology of oxygen transport*, Transfus. Sci. **18**, 425-35.

- Herman P., Trubel H.K. and Hyder F. (2006), *A multiparametric assessment of oxygen efflux from the brain*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **26**, 79-91.
- Hertz L., Peng L. and Dienel G.A. (2007), *Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **27**, 129-49.
- Hodgkin A.L. and Huxley A.F. (1952), *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, J. Physiol. **117**, 500-44.
- Hoge R.D., Franceschini M.A., Covolan R.J.M., Huppert T., Mandeville J.B. and Boas D.A. (2005), *Simultaneous recording of task-induced changes in blood oxygenation, volume, and flow using diffuse optical imaging and arterial spin-labeling MRI*, Neuroimage **25**, 701-7.
- Huettel S.A., Song A.W. and McCarthy G. (2003), *Functional magnetic resonance imaging*, Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
- Huppert T.J., Diamond S.G. and Boas D.A. (2006a), *Quantitative estimation of cerebral hemodynamic changes through the multimodality fusion of BOLD and diffuse optical tomography*, Proc. 12th Annual Meeting Human Brain Mapping (Florence).
- Huppert T.J., Hoge R.D., Diamond S.G., Franceschini M.A. and Boas D.A. (2006b), *A temporal comparison of BOLD, ASL, and NIRS hemodynamic responses to motor stimuli in adult humans*, Neuroimage **29**, 368-82.
- Huppert T.J., Hoge R.D., Dale A.M., Franceschini M.A. and Boas D.A. (2006c), *Quantitative spatial comparison of diffuse optical imaging with blood oxygen level-dependent and arterial spin labeling-based functional magnetic resonance imaging*, J. Biom. Opt. **11**, 064018.

- Huppert T.J. (2007a), *The Hemodynamic-Based Inference of Cerebral Oxygen Metabolism*, PhD Thesis, Harvard University.
- Huppert T.J., Allen M.S., Benav H., Jones P.B. and Boas D.A. (2007b), *A multi-compartment vascular model for inferring baseline and functional changes in cerebral oxygen metabolism and arterial dilation*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **27**, 1262-79.
- Huppert T.J., Jones P.B., Mesquita R.C., Devor A., Dunn A.K., Teng I.C., Dale A.M. and Boas D.A. (submitted), *Sensitivity of neural-hemodynamic coupling to alterations in cerebral blood flow during hypercapnia*, App. Opt.
- Hyder F., Rothman D.L. and Shulman R.G. (2002), *Total neuroenergetics support localized brain activity: implications for the interpretation of fMRI*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 10771-6.
- Johnson C.C. (1970), *Optical diffusion in blood*, IEEE Trans. Biomed. Eng. BME **17**, 129-33.
- Joseph D.K., Huppert T.J., Franceschini M.A. and Boas D.A. (2006), *Diffuse optical tomography system to image brain activation with improved spatial resolution and validation with functional magnetic resonance imaging*, App. Opt. **45**, 8142-51.
- Jöbsis F.F. (1977), *Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters*, Science **198**, 1264-67.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. (2000), *Principles of neural science*, 4th ed., McGraw-Hill, New York.
- Kasischke K.A., Vishwasrao H.D., Fischer P.J., Zipfel W.R. and Webb W.W. (2004), *Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis*, Science **305**, 99-103.

- Kastrup A., Kruger G., Neumann-Haefelin T., Glover G.H. and Moseley M.E. (2002), *Changes of cerebral blood flow, oxygenation, and oxidative metabolism during graded motor activation*, Neuroimage **15**, 74-82.
- Kim S.G., Rostrup E., Larsson H.B.W., Ogawa S. and Paulson O.B. (1999), *Determination of relative CMRO₂ from CBF and BOLD changes: significant increase of oxygen consumption rate during visual stimulation*, Magn. Res. Med. **41**, 1152-61.
- Kocsis L, Herman P. and Eke A. (2006), *The modified Beer-Lambert law revisited*, Phys. Med. Biol. **51**(5), N91-8.
- Korvenoja A., Kirveskari E., Aronen H.J., Avikainen S., Brander A., Huttunen J., Ilmoniemi R.J., Jääskeläinen J.E., Kovala T., Mäkelä J.P., Salli E. and Seppä M. (2006), *Sensorimotor cortex localization: comparison of magnetoencephalography, functional MR imaging, and intraoperative cortical mapping*, Radiology **241**, 213-22.
- Lent R. (2004), *Cem bilhões de neurônios - Conceitos fundamentais de neurociência*, Ed. Atheneu, São Paulo.
- Liu T.T. and Wong E.C. (2005), *A signal processing model for arterial spin labeling functional MRI*, Neuroimage **24**, 207-15.
- Lu H., Donahue M.J. and van Zijl P.C.M. (2006), *Detrimental effects of BOLD signal in arterial spin-labeling fMRI at high field strength*, Magn. Res. Med. **56**, 546-52.
- Luh W., Wong E., Bandettini P. and Hyde J. (1999), *QUIPSS II with thin-slice t1 periodic saturation: a method for improving accuracy of quantitative perfusion imaging using pulsed arterial spin labeling*, Magn. Reson. Med. **6**, 1246-54.
- Magistretti P.J., Pellerin L., Rothman D.L. and Shulman R.G. (1999), *Energy on demand*, Science **283**, 496-7.

- Mandeville J.B., Marota J.J., Ayata C., Zaharchuk G., Moskowitz M.A., Rosen B.R. and Weisskoff R.M. (1999), *Evidence of a cerebrovascular postarteriole windkessel with delayed compliance*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **19**, 679-89.
- Martin W.R. (2007), *MR spectroscopy in neurodegenerative disease*, Mol. Imaging Biol. **9**, 196-203.
- Mesquita R.C., Yucel M.A., Akin A., Devor A., Huppert T.J. and Boas D.A. (2008a), *Investigating neurovascular coupling in rat brain with optical imaging and physiological modeling*, In: *OSA Biomedical Optics* (St. Petersburg, FL, USA).
- Mesquita R.C., Radhakrishnan H., Mandeville J.B., Huppert T.J., Franceschini M.A., Covolan R.J.M. and Boas D.A. (2008b), *Imaging oxygen consumption with near-infrared spectroscopy and fMRI simultaneously*, In: *Human Brain Mapping* (Melbourne, Australia).
- Mesquita R.C. and Covolan R.J.M. (2008c), *Estudo funcional do cérebro através de NIRS e tomografia óptica de difusão*, In: *Neurociências e epilepsia (Série CInAPCe vol 1)*, Li L.M. (ed), Plêiade, São Paulo.
- Mesquita R.C., Huppert T.J. and Boas D.A. (2009), *Exploring neuro-vascular and neuro-metabolic coupling in rat somatosensory cortex*, Phys. Med. Biol. **54**, 175-185.
- Mesquita R.C., Radhakrishnan H., Covolan R.J.M., Boas D.A. and Huppert T.J. (submitted), *Use of simultaneous near-infrared spectroscopy and functional MRI recordings to image oxygen consumption during somatosensory cortex stimulation*, Neuroimage.
- Mintum M.A., Raichle M.E., Martin W.R. and Herscovitch P. (1984), *Brain oxygen utilization measured with O-15 radiotracers and positron emission tomography*, J. Nucl. Med. **25**, 177-87.

- Nangini C., Ross B., Tam F. and Gaham S.J. (2006), *Magnetoencephalographic study of vibrotactile evoked transient and steady-state responses in human somatosensory cortex*, *Neuroimage* **33**, 252-62.
- Nolte J. (2002), *The human brain - an introduction to its functional anatomy*, 5th Edition, Mosby Inc., Missouri (EUA).
- Ogawa S., Lee T.M., Kay A.R. and Tank D.W. (1990), *Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9868-72.
- Peterson J.F. (1986), *The development of pulse oximetry*, *Science* **232**, G135-40.
- Plichta M.M., Heinzl S., Ehlis A.C., Pauli P. and Fallgatter A.J. (2007), *Model-based analysis of rapid event-related functional near-infrared spectroscopy (NIRS) data: a parametric validation study*, *Neuroimage* **35**, 625-34.
- Riera J., Aubert E., Iwata K., Kawashima R., Wan X. and Ozaki T. (2005), *Fusing EEG and fMRI based on a bottom-up model: inferring activation and effective connectivity in neural masses*, *Phil. Trans. R. Soc. B* **360**, 1025-41.
- Riera J.J., Schousboe A., Waagepetersen S.H., Howarth C. and Hyder F. (2008), *The micro-architecture of the cerebral cortex: functional neuroimaging models and metabolism*, *Neuroimage* **40**, 1436-59.
- Ripoll J., Nieto-Vesperinas M., Arridge S.R. and Dehghani H. (2000), *Boundary conditions for light propagation in diffusive media with nonscattering regions*, *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* **17**, 1671-81.
- Roy S. and Sherrington S. (1890), *On the regulation of the blood-supply of the brain*, *J. Physiol.* **11**, 85-108.

- Sato H., Kiguchi M., Kawaguchi F. and Maki A. (2004), *Practicality of wavelength selection to improve signal-to-noise ratio in near-infrared spectroscopy*, Neuroimage **21**, 1554-62.
- Severinghaus J.W. (1979), *Simple, accurate equations for human blood O₂ dissociation computations*, J. Appl. Physiol. **46**, 599-602.
- Shouval H.Z., Castellani G.C., Blais B.S., Yeung L.C. and Cooper L.N. (2002), *Converging evidence for a simplified biophysical model of synaptic plasticity*, Biol. Cybern. **87**, 383-91.
- Shulman R.G., Hyder F. and Rothman D.L. (2001a), *Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98(11)**, 6417-22.
- Shulman R.G., Hyder F. and Rothman D.L. (2001b), *Lactate efflux and the neuroenergetic basis of brain function*, NMR Biomed **14**, 389-96.
- Sicard K.M. and Duong T.Q. (2005), *Effects of hypoxia, hyperoxia, and hypercapnia on baseline and stimulus-evoked BOLD, CBF and CMRO₂ in spontaneously breathing animals*, Neuroimage **25**, 850-8.
- Siegel A.M. (2004), *Investigating the temporal evolution of the cerebral hemodynamic response using diffuse optical tomography*, PhD thesis, Tufts University (Somerville, MA, EUA).
- Sotero R.C. and Trujillo-Barreto N.J. (2007), *Modeling the role of excitatory and inhibitory neuronal activity in the generation of the BOLD signal*, Neuroimage **35**, 149-65.
- Strangman G., Franceschini M.A. and Boas D.A. (2003), *Factors affecting the accuracy of near-infrared spectroscopy concentration calculations for focal changes in oxygenation parameters*, Neuroimage **18**, 865-79.

- Tanaka T., Riva C. and Ben-Sira I. (1974), *Blood velocity measurements in human retinal vessels*, Science **186**, 830.
- Toga A.W. and Mazziotta J.C. (2000), *Brain mapping: the systems*, 1st ed., Academic Press, California.
- Ulbert I., Karmos G., Heit G. and Halgren E. (2001), *Early discrimination of coherent versus incoherent motion by multiunit and synaptic activity in human putative MT+*, Hum. Brain Mapp. **13**, 226-38.
- Vazquez A.L., Cohen E.R., Gulani V., Hernandez-Garcia L., Zheng Y., Lee G.R., Kim S.G., Grotberg J.B. and Noll D.C. (2006), *Vascular dynamics and BOLD fMRI: CBF level effects and analysis considerations*, Neuroimage **32**, 1642-55.
- Veech R.L., Harris R.L., Veloso D. and Veech E.H. (1973), *Freeze-blowing: a new technique for the study of brain in vivo*, J. Neurochem. **20(1)**, 183-8.
- Villringer A. and Dirnagl U. (eds) (1997), *Advances in experimental medicine and biology (optical imaging of brain function and metabolism 2: physiological basis and comparison to other functional neuroimaging methods vol 413)* ed. N. Back, I.R. Cohen, D. Kritchevsky, A. Lajtha and R. Paoletti (New York: Plenum Press).
- Wang L., Jacques S.L. and Zheng L. (1995), *MCML - Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues*, Comp. Methods Progr. Biom. **47**. 131-46.
- Wang L.V. and Wu H. (2007), *Biomedical optics: principles and imaging*, 1st ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- Wobst P., Wenzel R., Kohl M., Obrig H. and Villringer A. (2001), *Linear aspects of changes in deoxygenated hemoglobin concentration and cytochrome oxidase oxidation during brain activation*, Neuroimage **13**, 520-30.

- Wong E., Buxton R. and Frank L. (1997), *Implementation of quantitative perfusion imaging techniques for functional brain mapping using pulsed arterial spin labeling*, NMR Biomed. **10**, 237-249.
- Yodh A.G. and Boas D.A. (2003), *Functional imaging with diffusing light*, In: *Biomedical photonics handbook* ed T. Vo-Dinh (Boca Raton, USA: CRC Press), 21.1-45.
- Zamboni C.B., ed. (2007), *Fundamentos da física de neutrons*, 1^a ed., Ed. Livraria da Física, São Paulo.
- Zhang N., Zhu X.H., Lei H., Ugurbil K. and Chen W. (2004), *Simplified methods for calculating cerebral metabolic rate of oxygen based on ^{17}O magnetic resonance spectroscopy imaging measurement during a short $^{17}O_2$ inhalation*, J. Cereb. Blood Flow Metab. **24**, 840-8.
- Zheng Y., Martindale J., Johnston D., Myles J., Berwick J. and Mayhew J. (2002), *A model of the hemodynamic response and oxygen delivery to brain*, Neuroimage **16**, 617-37.
- Zheng Y., Johnston D., Berwick J., Chen D., Billings S. and Mayhew J. (2005), *A three-compartment model of the hemodynamic response and oxygen delivery to brain*, Neuroimage **28** 925-39.