

F590 - Iniciação Científica I
Prof. José J. Lunazzi (Coordenador)

Relatório Final

Avaliação de metabólitos no cerebelo de pacientes com distonias utilizando ^1H -MRS



Thays Desiree Mineli (aluna)
thaysdesiree(arroba)gmail.com

Profa. Doutora Gabriela Castellano (orientadora)

gabriela(arroba)ifi.unicamp.br

Grupo de Neurofísica, Departamento de Raios Cósmicos e Cronologia,
Instituto de Física Gleb Wataghin, UNICAMP

Profa. Doutora Anelyssa D'Abreu (colaboradora)

anelyssa(arroba)gmail.com

Laboratório de Neuroimagem, Departamento de Neurologia,
Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP

Campinas, junho de 2012

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a aplicação da técnica de Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS, do inglês *Magnetic Resonance Spectroscopy*) para verificar alterações nas concentrações de metabólitos de pacientes com distonias em relação a indivíduos saudáveis (grupo controle). Neste relatório, apresentamos, primeiramente, um estudo sobre os princípios físicos do fenômeno da ressonância magnética e formação dos espectros, seguido de um estudo sobre os principais metabólitos mensuráveis com a técnica, e, então, dos métodos de pré-processamento e de quantificação dos sinais. Após, tem-se um estudo sobre as distonias. Para verificar as alterações metabólicas, foram utilizados dados de 23 pacientes e de 20 indivíduos controles, cujos sinais foram, primeiramente, pré-processados utilizando o software jMRUI. Ainda utilizando o mesmo software, foi feita a quantificação dos sinais pelo método AMARES permitindo-se, então, identificar os metabólitos N-Acetil-Aspartato, Creatina e Colina. Utilizando o teste-t, por meio do software Systat13, foi feita a análise estatística das amplitudes destes metabólitos e de suas razões. Foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles para a razão Cre/NAA ($p = 0.048$). Como a fosfocreatina está associada ao metabolismo e bioenergética do SNC, este resultado pode indicar alterações no cerebelo relacionadas a esse metabolismo.

Sumário

1.: Princípios Físicos do Fenômeno de Ressonância Magnética e Formação dos Espectros.....	1
1.1.: Ressonância Magnética e Equação de Larmor.....	1
1.2.: Magnetização.....	3
1.3.: Excitação.....	4
1.4.: Relaxação.....	5
1.5.: Detecção.....	6
1.6.: Formação do Espectro.....	7
1.6.1.: Transformada de Fourier e Características do Espectro.....	7
1.6.2.: Deslocamento Químico.....	8
1.6.3.: Acoplamento Spin-Spin.....	9
2.: Principais Metabólitos Encontrados em Espectros de ¹H-MRS do Cérebro e Aplicação da Técnica para Auxílio Diagnóstico em Neuropatologias.....	9
2.1.: N-Acetil-Aspartato (NAA).....	10
2.2.: Colina (Cho).....	10
2.3.: Creatina (Cre).....	10
2.4.: Glutamato (Glu) e Glutamina (Gln).....	11
2.5.: Lactato (Lac).....	11
2.6.: Aspartato (Asp).....	12
2.7.: Mio-inositol (mIno).....	12
2.8.: Glicose (Glc).....	12
2.9.: GABA.....	12
2.10.: Identificação dos Metabólitos em um Espectro do Cérebro.....	13
3.: Métodos de Pré-Processamento dos Sinais de MRS.....	14
3.1.: <i>Zero-filling</i>	14
3.2.: Apodização.....	14
3.3.: Correção da Linha de Base.....	16

3.4.: Filtragem do Sinal Residual da Água.....	16
3.5.: Correção de <i>Eddy Currents</i>	17
4.: Métodos de Quantificação dos Sinais de MRS.....	17
4.1.: Métodos de Análise.....	17
4.1.1.: Análise no Domínio da Frequência.....	18
4.1.2.: Análise no Domínio do Tempo.....	19
4.2.: Método LCModel.....	20
4.3.: Método AMARES.....	20
5.: Estudos sobre distonias.....	21
6.: Métodos.....	23
7.: Resultados e discussão.....	25
8.: Conclusões.....	27
9.: Referências Bibliográficas.....	29

Lista de Siglas

AMARES: Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data

Asp: Aspartato

Cho: Colina

Cre: Creatina

FID: Free Induction Decay

GABA: γ -aminobutyric acid

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

Lac: Lactato

LCModel: Linear Combination of Model spectra

mIno: Mio-inositol

MR: Magnetic Resonance

MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy

NAA: N-acetil-aspartato

PCre: Fosfocreatina

RF: Radiofrequência

SNC: Sistema Nervoso Central

SNR: Razão sinal-ruído (Signal to Noise Ratio)

1. Princípios Físicos do Fenômeno de Ressonância Magnética e Formação dos Espectros

1.1. Ressonância Magnética e Equação de Larmor

A ressonância magnética (MR, do inglês *Magnetic Resonance*) origina-se da interação entre um átomo e um campo magnético externo. A propriedade necessária à ressonância magnética é o momento angular intrínseco, ou spin nuclear. Os vetores de spin nuclear de uma amostra, na ausência de um campo magnético externo, são orientados randomicamente em todas as direções. Se a amostra é colocada em um campo magnético externo de intensidade constante \mathbf{B}_0 , os spins começarão a precessionar em torno do campo magnético. Por convenção, usa-se o eixo z como direção do campo \mathbf{B}_0 ; o eixo de precessão dos spins também está orientado nessa direção. O movimento de cada spin é dado pelo conjunto de coordenadas x, y (perpendiculares a \mathbf{B}_0) e z (paralelo a \mathbf{B}_0). E a frequência de precessão é expressa pela equação de Larmor, dada pela Equação 1.1

$$\omega_0 = \gamma \mathbf{B}_0, \quad (1.1)$$

na qual γ é a razão giromagnética, cujo valor para os prótons (núcleos de hidrogênio) é 42,58 MHz/T.

Partículas elementares possuem momento angular \mathbf{L} quantizado e dado pela Equação 1.2, na qual I é o número quântico de spin e h é a constante de Planck,

$$\mathbf{L} = \left(\frac{h}{2\pi} \right) \sqrt{I(I+1)} \quad (1.2)$$

Na mecânica quântica a direção do momento angular é especificada por um segundo número quântico (m), que pode somente ter certas orientações discretas e cujos valores

variam entre $+I$ e $-I$, correspondendo a um total de $2I+1$ valores. A componente de momento angular na direção z , L_z , é dada pela Equação 1.3.

$$L_z = \left(\frac{h}{2\pi} \right) m . \quad (1.3)$$

Partículas elementares também tem um momento magnético μ que é relacionado ao momento angular L através de:

$$\mu = \gamma \mathbf{L} . \quad (1.4)$$

Assim como o momento angular, o momento magnético também é quantizado e a sua componente ao longo do eixo- z longitudinal é dada por:

$$\mu_z = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m . \quad (1.5)$$

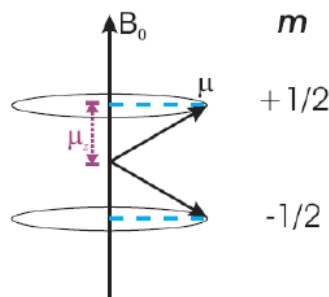


Figura 1.1: Momento magnético μ , para I igual a $1/2$, e sua componente longitudinal μ_z na presença de um campo magnético externo B_0 [4].

Na presença de campo magnético externo \mathbf{B}_0 (Figura 1.1), a partícula irá adquirir uma energia magnética dada pela Equação 1.6.

$$E = -\mu_z B_0 = -\gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m B_0 . \quad (1.6)$$

A interação entre o momento magnético e o campo magnético externo é conhecida como interação Zeeman e representada pela Figura 1.2.

Uma vez que m é um número quântico discreto, os níveis de energia são também quantizados. Para uma partícula de spin I igual a $1/2$, há somente dois níveis de energia (m é igual a $-1/2$ ou $+1/2$, respectivamente conhecidos como spin *down* e spin *up*) e a diferença de energia ΔE é dada pela Equação 1.7:

$$\Delta E = E_{\text{down}} - E_{\text{up}} = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) B_0 . \quad (1.7)$$

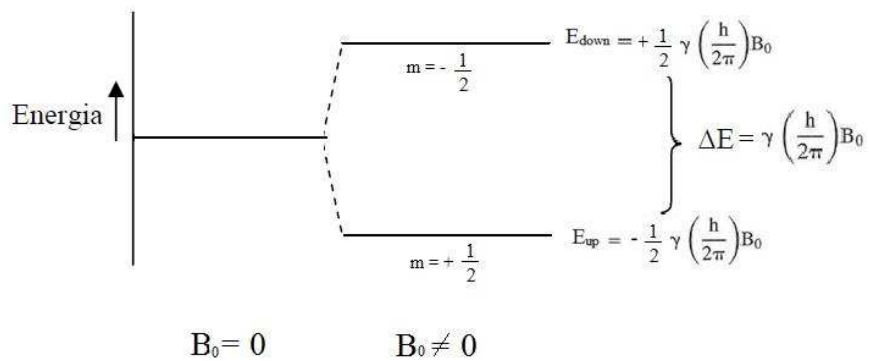


Figura 1.2: Interação Zeeman para spin nuclear igual a $1/2$. Na ausência do campo magnético externo, as energias dos estados *up* e *down* são degeneradas. Na presença do campo magnético, há o desdobramento da energia. Para $m = +1/2$, tem-se a menor energia (E_{up}) e para $m = -1/2$, a maior energia (E_{down}).

1.2. Magnetização

A distribuição dos spins nos possíveis níveis de energia é desigual e segue a distribuição de Boltzmann dada pela Equação 1.8,

$$n_i = n_{\text{total}} e^{(-E_i / kT)}, \quad (1.8)$$

na qual n_i é o número de spins com uma energia E_i (em Joules, J), n_{total} é o número total de spins da amostra, T é a temperatura (em Kelvins, K) e k , a constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$). A razão entre os números de spins para energias maiores e para

energias menores é, para o caso da Figura 1.2, dada pela Equação 1.9.

$$\frac{n_{\text{up}}}{n_{\text{down}}} = e^{\Delta E/kT} = e^{h\nu/kT} \approx 1 + \left(\frac{h\nu}{kT}\right). \quad (1.9)$$

O momento magnético total de uma amostra macroscópica, conhecido como magnetização (M), é a resultante dos momentos magnéticos individuais μ , como mostra a Figura 1.3. Devido à diferença de populações, a magnitude de M , em equilíbrio térmico, M_0 , será dada pela Equação 1.10, na qual nota-se sua proporcionalidade com B_0 .

$$M_0 = \sum_{i=1}^n \mu_i = \mu (n_{\text{up}} - n_{\text{down}}) = \left(\frac{\gamma h}{2\pi}\right)^2 \left(\frac{nB_0}{4kT}\right). \quad (1.10)$$

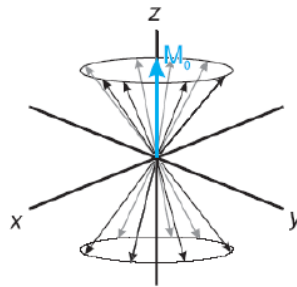


Figura 1.3: Em equilíbrio térmico, surge o vetor magnetização M_0 ao longo do eixo $+z$ (M_0 é proporcional à B_0) [2].

1.3. Excitação

A magnetização nuclear é observada a partir da detecção de seu movimento de precessão. Como ela é paralela ao eixo z , não pode ser detectada. Deve-se, então, rotacioná-la em direção ao plano transversal, aplicando um segundo campo magnético, na forma de um pulso de radiofrequência (RF).

Ao aplicar à amostra um pulso de radiofrequência perpendicular ao campo B_0 , com energia igual à diferença entre os níveis de energia e com frequência centrada em ω_0 , spins no estado de menor energia irão migrar para o estado de maior energia. A

redistribuição dos spins nos níveis de energia faz com que o vetor magnetização altere seu valor e direção. E as fases dos spins, que antes se anulavam no plano transversal, são alinhadas criando, dessa forma, uma componente de magnetização transversal. Quando a duração de aplicação do pulso é suficiente para fazer com que o vetor magnetização gire, ou “tombe”, totalmente para o plano transversal, ou seja, perpendicular a \mathbf{B}_0 , o pulso é conhecido como um pulso de 90° (Figura 1.4).

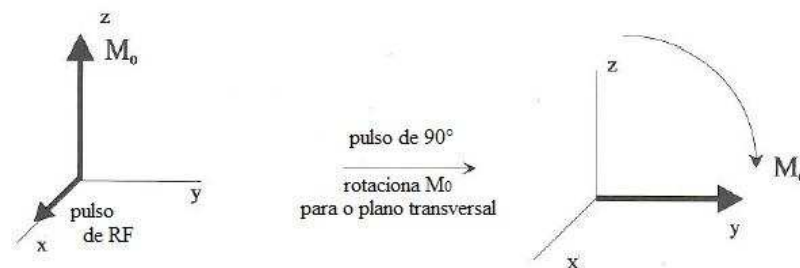


Figura 1.4: A aplicação do pulso de 90° faz com que a magnetização longitudinal seja levada para o plano transversal [3].

1.4. Relaxação

Relaxação é o processo pelo qual spins liberam sua energia de excitação e retornam ao estado inicial, quando o pulso de radiofrequência é desligado. Este fenômeno ocorre segundo dois processos diferentes e independentes: as relaxações transversal e longitudinal.

Conforme os spins liberam sua energia, com o passar do tempo, será observado um retorno da componente longitudinal da magnetização (M_z) ao seu valor de equilíbrio M_0 . Este retorno da magnetização longitudinal, conhecido como relaxação longitudinal, segue um processo de crescimento exponencial, com constante de tempo T_1 (Equação 1.11).

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (1.11)$$

Já a relaxação transversal corresponde ao declínio da magnetização no plano xy

(magnetização transversal, M_{xy}). Logo após a aplicação do pulso de RF de 90° , o vetor magnetização terá apenas a componente transversal. Após o desligamento do pulso de RF, os spins irão se defasar com o tempo. A perda da coerência dos spins ocorre ao mesmo tempo em que os spins liberam sua energia e reorientam-se ao longo de B_0 . A equação que descreve a relaxação transversal é dada pela Equação 1.12, e o tempo T_2 é a sua constante de tempo.

$$\vec{M}_{xy}(t) = \vec{M}_{xy}(0)e^{-t/T_2} \quad (1.12)$$

1.5. Detecção

Após a aplicação do pulso de 90° , a magnetização transversal gira em torno de \mathbf{B}_0 com a frequência de Larmor. Se colocada uma bobina com seu eixo paralelo ao plano transversal, a magnetização induzirá uma voltagem na bobina. A tensão induzida é o sinal de MR e é conhecida como indução por decaimento livre, ou FID (do inglês, *Free Induction Decay*).

O movimento da magnetização transversal, em função do tempo, pode ser representado por um gráfico no plano complexo, como mostra a Figura 1.5.

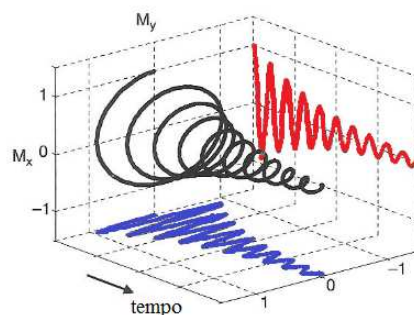


Figura 1.5: Relaxação no plano transversal em função do tempo. O valor de M_{xy} pode ser projetado nos planos xt e yt [2].

Então, pode-se separar M_{xy} em suas componentes M_x e M_y dadas pelas projeções nos

planos x_t e y_t , conhecidas como FID real e FID imaginário, respectivamente. Assim tem-se a relação dada pela Equação 1.13:

$$\text{FID} \propto M_{xy} = M_x + iM_y \quad (1.13)$$

1.6. Formação do Espectro

1.6.1. Transformada de Fourier e Características do Espectro

O FID é dado em função do tempo e para examinar um espectro, dado em termos de frequência, deve-se utilizar a ferramenta matemática Transformada de Fourier. Esta permite converter a amplitude do sinal em função do tempo para uma função de frequência, assim, o domínio do sinal é levado do domínio do tempo para o domínio da frequência (Figura 1.6).

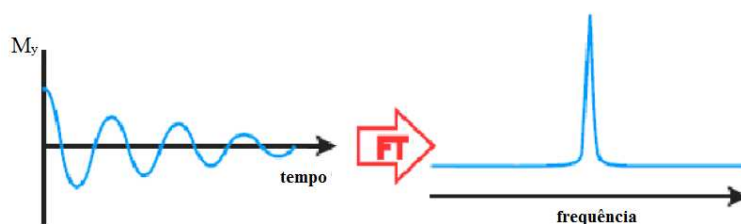


Figura 1.6: O FID no domínio do tempo e a aplicação da Transformada de Fourier que converte o sinal para o domínio da frequência [1].

Em um espectro de MR, há três características de interesse: a área integrada, a posição e a largura à meia altura de cada pico de ressonância. A área do pico é proporcional à quantidade de spins na respectiva frequência de ressonância. A posição do pico, que é dada pela sua frequência de ressonância, é utilizada para identificar o tipo de spin e sua molécula em particular. A largura à meia altura revela características do meio através do formato do pico, dado por duas linhas de forma: a Lorentziana e a Gaussiana.

1.6.2. Deslocamento Químico

A frequência de ressonância ω_0 não depende somente da razão giromagnética e do campo magnético externo, deve-se considerar, também, o ambiente químico do núcleo de interesse.

Nas moléculas, os elétrons são distribuídos ou compartilhados entre átomos, formando uma nuvem eletrônica. Assim, na presença de um campo magnético, os elétrons irão interagir com o campo, pois a carga negativa do spin eletrônico gera um campo magnético, que “blinda”, o núcleo do campo magnético externo, fenômeno conhecido como “blindagem química” [5]. O campo magnético total (**B**) conterà os termos do campo magnético principal e da blindagem química. A blindagem química afeta o efeito Zeeman, assim, a frequência de ressonância expressa pela equação de Larmor deve ser modificada (Equação 1.14):

$$\omega = \gamma B_0 (1 - \sigma) , \quad (1.14)$$

na qual ω é a frequência resultante do spin.

Embora normalmente se utilize como unidade de frequência o Hertz (Hz), a unidade mais conveniente em MRS é partes por milhão (ppm). A escala ppm define as diferenças de frequência para a frequência de ressonância do spin em relação à uma frequência de referência, esta é representada na Equação 1.15 por ω_{ref} . As diferenças de frequências, expressas como diferenças relativas, δ , são denominadas deslocamento químico.

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \times 10^6 \quad (1.15)$$

O deslocamento químico permite a identificação de núcleos e grupos funcionais dentro de moléculas, pois um mesmo átomo pode estar em diferentes moléculas de uma

amostra, e, assim, sua blindagem química será variada. Cada um dos átomos iguais da amostra sentirá um campo magnético diferente e, conseqüentemente, terá uma absorção diferente do pulso de radiofrequência, de forma que o sinal emitido na relaxação tenha valores desiguais. O resultado desse fenômeno é a formação de diversos picos no domínio das frequências, formando o espectro de MRS.

1.6.3. Acoplamento Spin-Spin

Acoplamento spin-spin é uma interação molecular que também altera a frequência de ressonância do spin. Este fenômeno origina-se da interação do momento magnético nuclear com o momento magnético dos elétrons nas ligações químicas, causando a divisão dos níveis de energia em valores intermediários e, conseqüentemente, dividindo as linhas de ressonâncias em várias linhas menores [2].

2. Principais Metabólitos Encontrados em Espectros de ¹H-MRS do Cérebro e Aplicação da Técnica para Auxílio Diagnóstico em Neuropatologias

Cada metabólito possui um espectro característico de acordo com as frequências de ressonância de seus prótons. Isto permite a identificação de cada metabólito pela sua posição no espectro.

Os principais metabólitos do cérebro humano detectados em uma espectroscopia por ressonância magnética utilizando o núcleo do hidrogênio (¹H)¹ são N-acetil-aspartato (NAA), colina (Cho), creatina (Cre) e fosfocreatina (PCre), glutamato (Glu) e glutamina (Gln), lactato (Lac), aspartato (Asp), mio-inositol (mIno), glicose e GABA.

¹ Este foi o núcleo utilizado neste trabalho.

2.1. N-Acetil-Aspartato (NAA)

O NAA é um aminoácido livre, localizado no sistema nervoso central e periférico em altas concentrações. É um marcador de densidade neuronal e, no espectro normal (de uma pessoa sadia), corresponde ao pico mais elevado situado em 2,02 ppm, possuindo, também, outros picos menores em 2,49 ppm e 2,69 ppm.

Sua concentração diminui proporcionalmente ao dano celular, como em diferentes tipos de tumores cerebrais, esclerose múltipla, fases crônicas de acidente vascular cerebral (AVC), indicando perda ou disfunção neuronal da região afetada [2].

2.2. Colina (Cho)

O sinal total da colina é formado por colina livre, glicerofosforilcolina e fosforilcolina. Sua distribuição não é homogênea no cérebro, já que na substância branca possui maior concentração do que na substância cinzenta. O pico do sinal está em 3,22 ppm e corresponde ao segundo maior pico do espectro. Em 3,54 ppm e 4,05 ppm têm-se outros dois picos referentes a um dubleto [2].

A colina livre participa do metabolismo das membranas, de forma que um aumento desta reflete aumento na síntese de membranas ou aumento da população celular, indicando, assim, a presença de tumores [4].

2.3. Creatina (Cre) e fosfocreatina (PCre)

A creatina e a fosfocreatina relacionam-se com o sistema de energia celular, servindo como reserva de fosfatos para o sistema ADP-ATP. Como indica o estado energético, a creatina serve de indicativo da presença de tumores, por exemplo.

A concentração da creatina total é relativamente constante no tecido cerebral. Por isso, é geralmente usada como referencial interno para os demais picos. Corresponde ao terceiro pico mais elevado do espectro e está localizado em 3,03 ppm, possuindo um

segundo pico em 3.93ppm [2].

2.4. Glutamato (Glu) e Glutamina (Gln)

O glutamato é o aminoácido com maior concentração no cérebro e atua como neurotransmissor excitatório, ou seja, favorece a passagem do impulso nervoso. Participa do metabolismo mitocondrial e, através de enzimas, é sintetizado a partir da glutamina, que participa na regulação da atividade dos neurotransmissores.

As frequências de ressonância desses metabólitos são muito próximas na curva espectral e com picos de baixa intensidade, e em campos menores que 3T estes picos são representados pela somatória em uma única ressonância conhecida como Glx, o que melhora a sua observação. O espectro é formado por diversos picos individuais, em aproximadamente 3,75 ppm para ambos metabólitos, e picos entre 2,04ppm e 2,35 ppm para o glutamato e entre 2,12 ppm e 2,46 ppm para a glutamina, porém a superposição de picos de outros metabólitos dificulta a visualização desses picos individuais [2].

2.5. Lactato (Lac)

O lactato é o produto final da respiração anaeróbica. Já em condições aeróbicas sua concentração é muito baixa, razão pela qual não se observa seu pico normalmente em espectroscopia *in vivo*. A presença deste metabólito no espectro indica alteração na respiração oxidativa normal, o que ocorre em neoplasias e isquemia cerebral.

No espectro, o lactato aparece como um dublete localizado em 1,33 ppm e corresponde a uma somatória de sinais na mesma faixa de ressonâncias [2]. Geralmente é sobreposto por um pico de lipídeos na presença de tumores, o que dificulta sua quantificação.

2.6. Aspartato (Asp)

O aspartato é um neurotransmissor excitatório do cérebro. Seus picos situam-se em 2,65 ppm, 2,80 ppm e 3,89 ppm [2]. A quantificação *in vivo* deste metabólito também é difícil, devido à superposição de seus picos com outros picos maiores do espectro.

2.7. Mio-inositol (mIno)

O mio-inositol não possui função bem conhecida, mas acredita-se que esteja envolvido com o crescimento celular e armazenamento de glicose.

Serve como marcador de demências, como Alzheimer, quando a sua elevação é associada com redução do pico de NAA. Alterações de sua concentração também são observadas em encefalopatia hepática e danos cerebrais em tumores malignos.

Possui quatro picos de ressonância: em 3,28 ppm, sobreposto pelo pico da colina, 3,54 ppm, 3,60 ppm e 4,05 ppm, este último não aparece devido à supressão da água [2]. Este metabólito geralmente é observado em experimentos com tempo ao eco mais curto (da ordem de 30ms), pois possui uma constante de decaimento T_2 bem curta [6].

2.8. Glicose (Glc)

A glicose é um substrato essencial para o cérebro, funcionando como fonte de energia e como precursora para outros componentes. Possui um pico em 4,63 ppm, que é eliminado durante a supressão da água na aquisição dos dados de MRS (ver Seção 4.4). Os outros picos aparecem entre 3,43 ppm e 3,80 ppm [2].

2.9. GABA

O ácido γ -aminobutírico (GABA, do inglês *γ -aminobutyric acid*) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido na proliferação, migração e promoção da sobrevivência das células. Portanto, o aumento de

sua concentração é um indicador de tumor cerebral. Sua concentração também é alterada em casos de distúrbios psiquiátricos como epilepsia, depressão e síndrome do pânico.

Seus picos aparecem em 1,89 ppm, 2,28 ppm e 3,01 ppm [2], também superpostos a outros picos maiores. Mas a detecção de GABA é possível com a utilização de técnicas de edição espectral [7].

2.10. Identificação dos Metabólitos em um Espectro do Cérebro

Com o conhecimento dos principais metabólitos presentes em um espectro de ^1H -MRS do cérebro e localização dos seus respectivos picos, pode-se, agora, identificá-los no espectro da Figura 3.1.

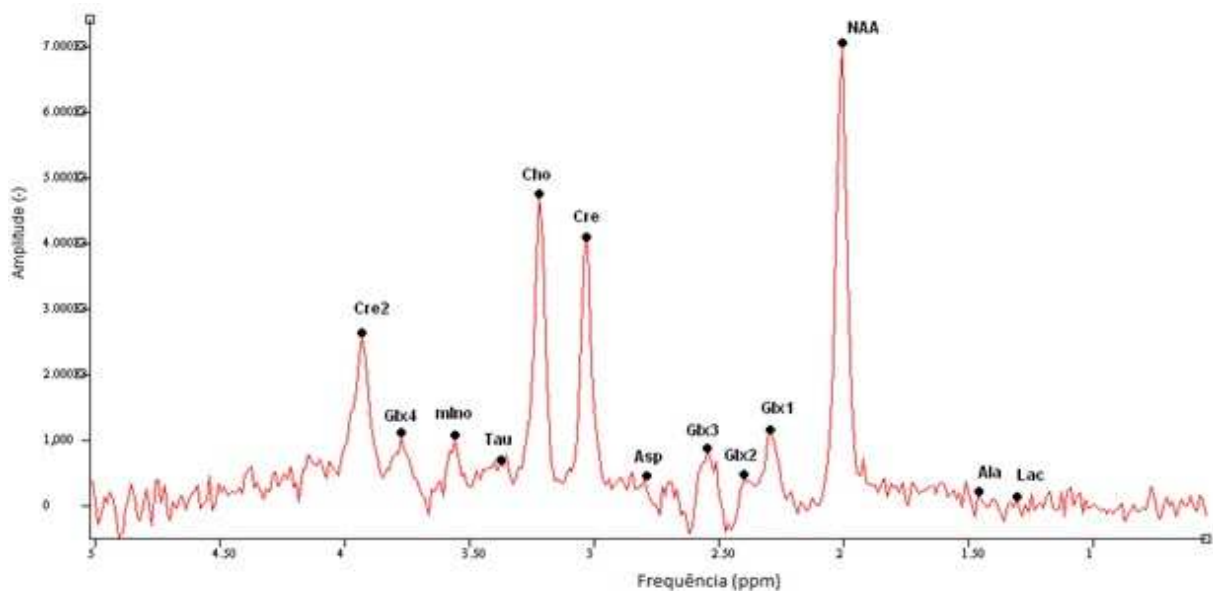


Figura 2.1: Exemplo de um espectro com a identificação de seus metabólitos. Cre e a Cre2 correspondem à creatina mais fosfocreatina; Tau, à taurina; mIno, ao mio-inositol; Cho, aos compostos que contêm colina; Ala, à alanina; Lac, ao lactato; Asp, ao aspartato; NAA, ao N-acetil-aspartato; e Glx1, 2, 3 e 4, ao glutamato mais glutamina, com um pouco de glicose e GABA.

3. Métodos de Pré-Processamento dos Sinais de MRS

O processamento do sinal de MRS é feito a fim de reduzir efeitos que prejudicam a correta análise do espectro. Dentre esses efeitos têm-se ruídos de fundo, indução de corrente no aparelho de ressonância magnética e pico residual da água. Assim, as etapas do processamento do sinal usualmente aplicadas são *zero-filling*, apodização, correção de linha de base, filtragem do sinal residual da água e correções das correntes induzidas (*eddy currents*).

3.1. Zero-filling

Zero-filling consiste de uma técnica em que se acrescentam, no domínio do tempo, pontos de amplitude zero ao final do FID, a fim de melhorar a resolução do espectro, permitindo a visualização de detalhes e a definição, com precisão, da posição e altura dos picos.

Assim, uma forma para se aumentar o número de pontos de digitalização é adquirir um espectro com 1024 pontos, por exemplo, e preenchê-lo até 2048 pontos com a técnica de *zero-filling*. Este espectro terá a mesma resolução do que um adquirido com 2048 pontos, embora este possua informação que o espectro *zero-filled* não possui.

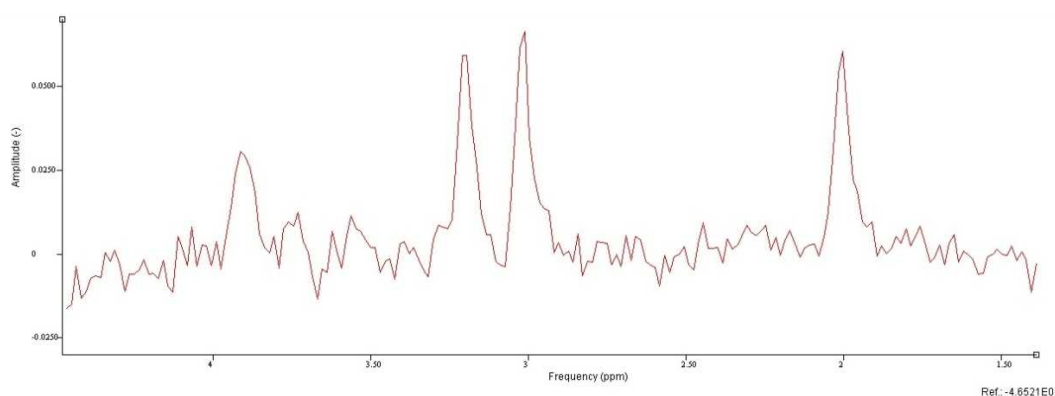
Nos casos em que o FID não tenha decaído completamente, a aplicação de *zero-filling* causa uma descontinuidade na amplitude do sinal, e a Transformada de Fourier deste produzirá ondulações na linha de base do espectro resultante, conhecidos como artefatos de truncamento.

3.2. Apodização

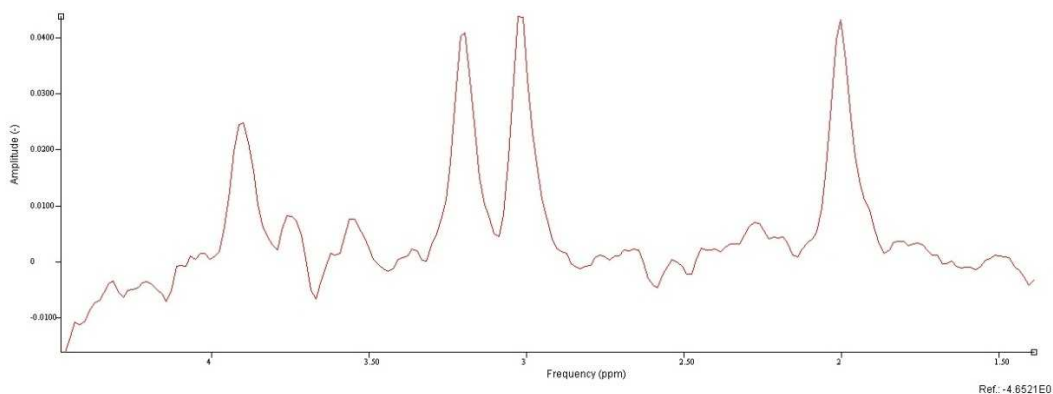
Para melhorar a razão sinal-ruído e reduzir os artefatos de truncamento, ou melhorar a resolução espectral, utiliza-se a técnica de apodização. Esta consiste da multiplicação

do FID por uma função filtro, que pode aumentar ou decair com o tempo. Esta multiplicação numérica do sinal digitalizado no domínio do tempo é feita por um filtro digital, ou seja, é realizada através de um *software*.

As funções de apodização mais utilizadas clinicamente são a Lorentziana e a Gaussiana. Quando é utilizada a função filtro que decai com o tempo, o sinal é melhorado no início da coleta dos dados e o ruído é suprimido no final. Isto melhora a razão sinal-ruído, porém aumenta a largura dos picos (piora a resolução). A apodização também é utilizada para reduzir os artefatos de truncamento, já que a multiplicação de um FID truncado por uma função filtro suaviza o decaimento do sinal, eliminando as descontinuidades.



(a)



(b)

Figura 3.1: (a) Espectro antes da apodização. (b) Espectro após a apodização (utilizando um filtro Lorentziano que decai no tempo), no qual foi utilizado um valor alto de apodização, 10Hz, para melhor visualização do efeito. O espectro tem seu ruído diminuído quando comparado com o espectro (a).

3.3. Correção da Linha de Base

A linha de base de um espectro de MR, normalmente, é plana. Existem, porém, fatores que a distorcem, causando ondulações que impedem uma correta medida da área do pico. As distorções podem ocorrer devido a atrasos entre o pulso de RF de excitação e o início da coleta do sinal ou devido a não subtração do sinal residual da água (Figura 3.2), já que as bordas do pico da água causam um declínio na linha de base.

Um método usado para corrigir tais distorções é um ajuste de seções de linha de base que estão entre os picos de uma curva, e após subtrair este ajuste do espectro. As correções de linha de base devem ser feitas cuidadosamente a fim de não distorcer as intensidades do sinal.

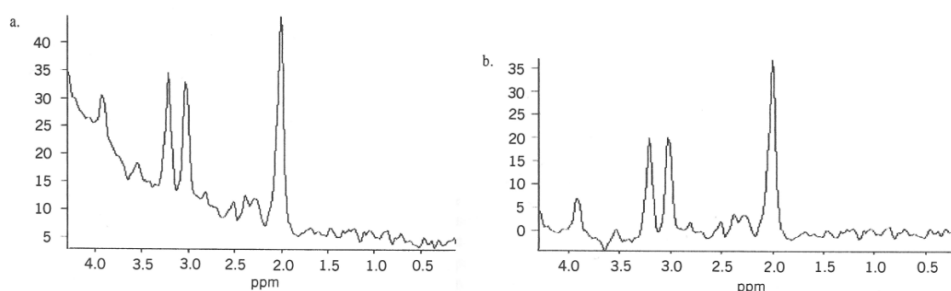


Figura 3.2: Em (a), o espectro possui a linha de base distorcida devido à incompleta supressão da água. Já em (b), tem-se o espectro com a correção da linha de base [5].

3.4. Filtragem do Sinal Residual da Água

Embora seja feita a supressão da água com a aplicação do pulso CHESSE, tem-se um pico residual no espectro. Este sinal residual deve ser eliminado, pois pode distorcer a linha de base, além de impedir a visualização de alguns picos de metabólitos. A remoção do pico residual da água é feita por um *software*, através da aplicação de um filtro.

3.5. Correção de *Eddy Currents*

Eddy currents, ou correntes de Foucault, é o nome dado à corrente elétrica induzida em um condutor quando o fluxo magnético através deste varia. Em MR, ocorre devido às variações dos gradientes do campo magnético e são induzidas nas peças de metal do sistema de MR. Se não corrigidas, estas correntes podem distorcer o sinal, criando artefatos no espectro.

Para corrigir as distorções, utiliza-se um sinal de referência, como o sinal da água sem supressão, que deve ser obtido sequencialmente com os sinais dos metabólitos. O sinal dos metabólitos é corrigido, após, subtraindo a fase do FID da água sem supressão da fase do FID dos metabólitos.

4. Métodos de Quantificação dos Sinais de MRS

4.1. Métodos de Análise

Um ponto importante na quantificação dos sinais de MR é decidir em qual domínio, da frequência ou do tempo, a análise deve ser realizada. A vantagem da análise no domínio da frequência é que o processo de quantificação pode ser interpretado diretamente através de uma inspeção visual, porém, cálculos em tal domínio são computacionalmente mais exigentes que no domínio do tempo, pois no primeiro são feitas convoluções e no segundo, multiplicações. Outro exemplo de fator que favorece um ou outro domínio é a remoção, no domínio do tempo, de pontos distorcidos no início do sinal, o que não afeta a análise no mesmo domínio, já que os pontos removidos podem ser recuperados através de extrapolação dos dados.

4.1.1. Análise no Domínio da Frequência

A quantificação no domínio da frequência pode ser feita pelo procedimento de integração numérica, que consiste na integração direta da área total debaixo do pico de ressonância. Devido à sobreposição de ressonâncias, à baixa razão sinal-ruído (SNR, do inglês *Signal to Noise Ratio*) e às distorções na linha de base, para calcular as áreas dos picos usam-se funções modelos em métodos de ajustes computacionais.

O sinal da ressonância no domínio do tempo (FID), em circunstâncias experimentais ideais, corresponde a uma soma de senóides com decaimento exponencial. A transformada de Fourier dá origem ao espectro (domínio da frequência) constituído de uma soma de linhas Lorentzianas, por isso, estas são utilizadas como funções modelo de ajuste de dados. Por simplicidade, a função modelo $F_{calc}(v,P)$ (Equação 4.1) expressa-se apenas pela parte real da Lorentziana, na qual, para uma dada linha i , a_i é a metade da largura da linha, I_i é a amplitude, ν_i é a frequência de ressonância e φ_i é a fase. O numero total de linhas é m e P denota o vetor de parâmetros estimados (frequências, larguras de linhas, intensidade, fases) [1].

$$F_{calc}(v,P) = \sum_{i=1}^m \left[\frac{a_i^2 I_i}{a_i^2 + 4(\nu - \nu_i)^2 \cos \varphi_i} + \frac{2a_i I_i (\nu - \nu_i)}{a_i^2 + 4(\nu - \nu_i)^2} \sin \varphi_i \right], \quad (4.1)$$

Entretanto, na prática, devido aos artefatos introduzidos pelo equipamento e às inhomogeneidades da amostra (como efeitos de *eddy currents* e variações de susceptibilidade, respectivamente), a Transformada de Fourier irá resultar em uma forma de linha não ideal. Para contornar este problema, outras formas de linha têm sido usadas, das quais a Gaussiana e Voigt (que contem componentes da Lorentziana e da Gaussiana, Equação 4.2) são as mais comuns:

$$F_{cal}(v, P) = \sum_{i=1}^m [w_L L_i(v) + w_G G_i(v) + B(v)], \quad (4.2)$$

na qual L_i e G_i denotam, respectivamente, as formas de linha Lorentziana e Gaussiana, w_L e w_G são os fatores de ponderação utilizados na combinação das formas de linha e $B(v)$ é um polinômio adicionado para considerar a possível contribuição da linha de base.

4.1.2. Análise no Domínio do Tempo

O FID é composto de uma soma de senóides que decaem exponencialmente e, em MR digital, este sinal é digitalizado em N intervalos de tempo Δt . O n -ésimo ponto será, então, digitalizado em:

$$t_n = t_0 + n\Delta t \quad n = 0, 1, \dots, N-1, \quad (4.3)$$

na qual t_0 é o tempo em que o primeiro ponto é digitalizado. Em notação complexa, a função modelo (\hat{y}_n com circunflexo) para o ajuste dos dados medidos (y_n sem circunflexo), para um total de K metabólitos, é descrita pela Equação 4.4, na qual a_k é a amplitude, ϕ_k é a fase de ordem zero e um fator adicional de fase de ordem k , d_k é o fator de decaimento, f_k é a fase da k -ésima senóides ($k = 1, \dots, K$) e e_n é um termo (complexo) do ruído branco gaussiano [1].

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(i\phi_k) \exp[(-d_k + i2\pi f_k) t_n] + e_n, \quad (4.4)$$

Assim como no domínio da frequência, ocorrem desvios do modelo ideal no domínio temporal. Pode-se, então, utilizar uma função modelo alternativa, dada pela Equação 4.5:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(i\phi_k) \exp[(-g_k t_n + i 2\pi f_k) t_n] + e_n, \quad (4.5)$$

na qual g_k é o fator de decaimento gaussiano. Pode ainda ser utilizada a função modelo de Voigt (Equação 4.6), que combina as funções modelo Lorentziana e Gaussiana.

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(j\phi_k) \exp[(-d_k - g_k t_n + j 2\pi f_k) t_n] + e_n. \quad (4.6)$$

4.2. Método LCModel

O LCModel (*Linear Combination of Model spectra*), implementado no *software* de mesmo nome, é um método no domínio da frequência que analisa espectros através de uma combinação linear de uma base de modelos de espectros completos dos metabólitos. Esta base de espectros pode ser obtida a partir de medidas de MRS *in vitro* de metabólitos isolados, ou pode ser simulada através de *softwares*.

A utilização de espectros completos, ao invés de apenas ressonâncias únicas, se deve ao fato de que os metabólitos geram múltiplas ressonâncias no espectro. Outro detalhe importante é que todos os metabólitos presentes no espectro devem também estar incluídos na base, a fim de evitar erros na análise.

4.3. Método AMARES

O AMARES (*Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data*), implementado no *software* jMRUI, é um método de quantificação no domínio do tempo. Neste método, o usuário fornece informações já conhecidas sobre as ressonâncias para quantificar o espectro, e o método ajusta os dados experimentais (y_n) por uma função modelo (\hat{y} com circunflexo), cuja equação é dada por:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(i\phi_k) \exp[j(-d_k(1-g_k + g_k t_n)t_n) + i2\pi f_k t_n] + e_n. \quad (4.7)$$

A quantificação permite determinar os valores da amplitude (a), decaimento (d), frequência (f) e fase (Φ). Diferentemente da Equação 4.6, esta função permite escolher entre uma forma de linha Lorentziana ($g_k = 0$) ou Gaussiana ($g_k = 1$) para cada pico do espectro.

5. Estudo sobre distonias

As distonias são distúrbios caracterizados por contrações musculares involuntárias, produzindo movimentos lentos e repetitivos ou posturas anormais [8]. Sua direção é constante, e os grupos musculares envolvidos são sempre os mesmos em dado paciente [9].

Existem várias formas diferentes de distonias, podendo afetar apenas um músculo, um grupo de músculos ou o corpo todo. Assim, podem ser classificadas de acordo com a localização de sua ocorrência em focal, segmentar, generalizada, multifocal e hemidistonia. As distonias focais atingem uma região limitada do corpo como olhos, mandíbula ou pescoço. Já nas distonias segmentares, vários grupos musculares vizinhos são atingidos. As distonias generalizadas são as mais raras e envolvem as pernas, troncos e outra parte do corpo. As hemidistonias atingem membros de um mesmo lado do corpo. E, por fim, a distonia multifocal ocorre quando duas ou mais partes não vizinhas do corpo são afetadas [10]. A incidência das distonias é estimada em 24 casos por milhão de habitantes por ano para as distonias focais e 2 casos por milhão de

habitantes por ano para as distonias generalizadas. Devido à dificuldade de diagnóstico, a real incidência desta doença é provavelmente muito superior [11].

Estudos têm mostrado que os movimentos anormais da doença são resultantes de disfunção nos gânglios basais. As alterações podem consistir em anomalias no processamento de neurotransmissores pelo cérebro e/ou alterações no processamento de informação e geração de comandos de movimento pelo cérebro [8]. Outros estudos têm ainda demonstrado de forma consistente envolvimento do cerebelo, das vias cerebelares e do tálamo em pacientes com distonia [12].

A doença pode ser hereditária ou causada por fatores como, por exemplo, problemas ao nascimento, trauma físico, infecção, intoxicação (por metais pesados), reação a medicamentos e acidente vascular cerebral. As primeiras manifestações da doença podem ser imperceptíveis, aparecendo apenas em algumas ações do dia como escrever, andar ou falar. Com o passar do tempo, as contrações musculares passam a ser mais frequentes e intensas, ocorrendo até mesmo durante o repouso, com possíveis dores musculares [8]. Não existe cura para a distonia, nem medicamentos que a previnam ou que retardem a sua evolução. Mas existem tratamentos que aliviam os sintomas, como relaxantes musculares que reduzem a intensidade das contrações, assim como a toxina botulínica injetada no músculo para tratamento local. Para alguns tipos de distonias há a possibilidade de cirurgia [10].

A técnica de MRS pode ser utilizada na avaliação de pacientes com distonia, pois permite a quantificação não invasiva *in vivo* de alguns compostos químicos de importância biológica [13]. O NAA é um marcador de densidade neuronal, pois tem sua concentração diminuída proporcionalmente com o dano celular, indicando perda neuronal. A colina participa do metabolismo das membranas, assim mudanças na

intensidade do pico de ressonância da Cho resultam principalmente de uma elevação das concentrações de fosfolipídios de membrana liberados para o meio extracelular durante a destruição da mielina. Portanto, a intensidade do pico de ressonância da Cho aumenta na presença de lesões desmielinizantes. A concentração de creatina total é relativamente constante no tecido cerebral na maioria dos casos, e como é um indicador do estado energético, serve de indicativo da presença de tumores cerebrais. Assim, alterações metabólicas em pacientes com distonias utilizando MRS podem auxiliar no entendimento dos mecanismos metabólicos deste grupo de doenças.

6. Métodos

É importante ressaltar, primeiramente, que a análise dos espectros *in vivo* deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da UNICAMP.

Para o trabalho, foram utilizados os dados de 23 pacientes com distonias, com idades entre 31 e 85 anos, sendo 17 deles mulheres e 6 homens, e 20 indivíduos controles com idades entre 23 e 68 anos, sendo 14 deles mulheres e 6 homens. A média das idades dos pacientes é $(62,0 \pm 13,5)$ anos. Os controles possuem a média de idade de $(50,2 \pm 11,8)$ anos.

Os espectros foram quantificados utilizando o método AMARES, através do *software* jMRUI. Foram aplicados a eles os métodos de pré-processamento de correção de linha de base e apodização utilizando uma Lorentziana com frequência de 2Hz.

O *software* jMRUI, após a quantificação do sinal de um dado espectro, fornece os valores da amplitude e do desvio padrão da amplitude dos FIDs correspondentes a cada pico de ressonância dos metabólitos analisados, como apresentado no exemplo da

Figura 6.1. Neste trabalho os metabólitos analisados nas quantificações foram o N-Acetil-Aspartato, a Creatina (Cre e Cre2) e a Colina. Os valores resultantes para os metabólitos que apresentaram razão entre o desvio padrão e a amplitude maior do que 0,3 foram desconsiderados, pois possuíam uma baixa razão sinal-ruído².

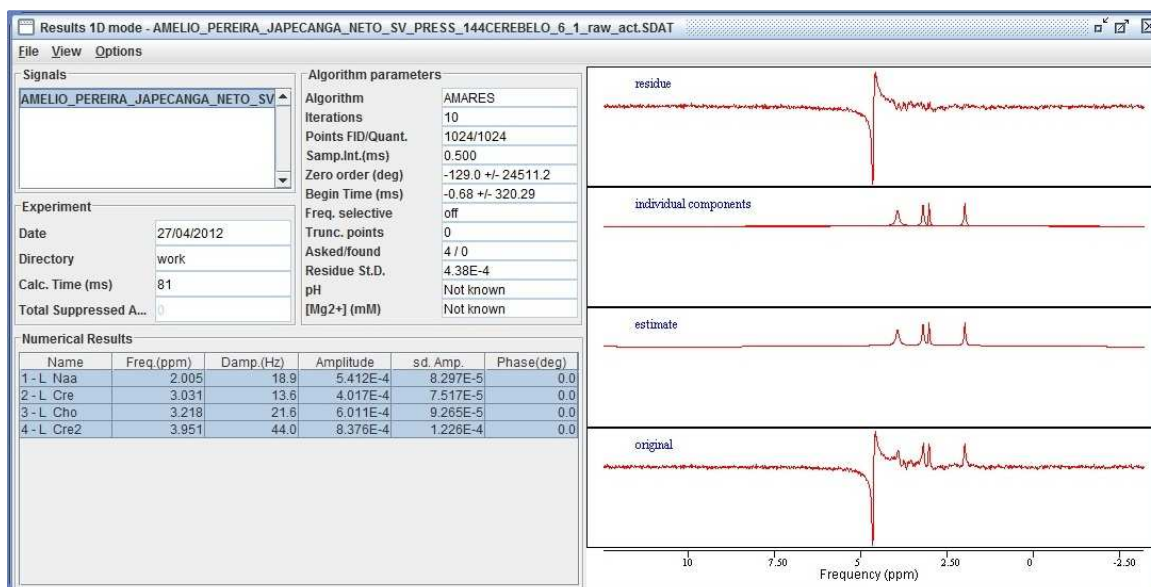


Figura 6.1: Exemplo de resultado da quantificação de um espectro fornecido pelo software jMRUI.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando um teste de hipóteses. Este teste parte do princípio de existência da hipótese Nula (H_0), que se julga ser verdadeira, e da hipótese Alternativa (H_1), aceita se a primeira hipótese for rejeitada. O resultado do teste diz se a segunda hipótese pode ser aceita ou se a primeira hipótese não deve ser descartada. Para uma hipótese Nula ser aceita, precisa-se definir o seu nível de significância. Para saber quando a hipótese Nula deve ou não ser rejeitada calcula-se o valor-p, que é comparado com o nível de significância. Se o valor-p for menor do que o nível de significância, então se tem um resultado significativo. Quanto menor for o valor-p, maior a probabilidade de a hipótese nula ser rejeitada [17].

² A razão sinal-ruído pode ser estimada dividindo o valor da amplitude pelo respectivo desvio padrão; portanto um desvio padrão relativo (i.e., desvio padrão/amplitude) de 0,3 corresponde a uma SNR (amplitude/desvio padrão) de 3,333. Este valor de SNR está de acordo com o critério de Rose [3], pelo qual é necessária uma SNR com valor entre 3 e 5 para a correta detecção do objeto, 24 (neste caso, pico de ressonância) desejado.

O teste de hipóteses utilizado foi o teste t. Este é utilizado quando os dados são provenientes de duas amostras de observações independentes. A hipótese Nula deste teste diz que as duas amostras possuem médias iguais, ou seja, são da mesma população [17]. O nível de significância utilizado foi de 0,05, de forma que valores-p maiores do que 0,05 indicam que não há diferenças nas concentrações relativas dos metabólitos analisados entre os grupos controle e paciente. Para obter os valores-p deste trabalho foi utilizado o *software* Systat13. E, assim, foi calculado o valor-p para as concentrações relativas dos metabólitos obtidas através da quantificação dos sinais.

7. Resultados e discussão

O *software* Systat13 foi utilizado para o cálculo do valor-p das concentrações absolutas dos metabólitos e das concentrações relativas ao NAA. É importante notar o fato de que em análises de dados de MRS *in vivo* geralmente usam-se concentrações relativas e não absolutas. Isso se refere à impossibilidade de obter valores acurados para o fator de ganho do aparelho utilizado em cada aquisição [2]. Para um grande número de neuropatologias, a creatina total tende a não se alterar, sendo, portanto, o metabólito mais usado como referência para cálculo das concentrações relativas. Neste trabalho, como não sabíamos se esse seria o caso, foi realizado inicialmente um teste-t utilizando as concentrações absolutas, para ver se havia diferenças entre as populações para o NAA, Cre e Cho (Tabela 7.1). Embora os valores-p não se mostrassem significantes para nenhum dos casos (todos resultaram maiores que 0,05), o valor-p para a Cre mostrou uma tendência a ser significativa ($p = 0,056$). Já o valor-p para o NAA ficou próximo de 1 (Tabela 7.1), pelo que utilizou-se, então, este metabólito como referência.

Os valores-p obtidos estão apresentados na Tabela 7.1. Os valores destacados em azul correspondem aos valores-p maiores do que 0,05, já o destaque em vermelho corresponde ao valor-p menor do que 0,05.

Variável	Valor-p	Valor Médio Controles	Valor Médio Pacientes
NAA	0,801	0,9530 ± 0,0001	0,9590 ± 0,0001
Cre	0,056	0,0006 ± 0,0002	0,0007 ± 0,0003
Cho	0,110	0,0004 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0001
Cre2	0,081	0,0005 ± 0,0002	0,0006 ± 0,0002
Cre / NAA	0,048	0,8405 ± 0,1672	0,9900 ± 0,2597
Cho / NAA	0,361	0,7012 ± 0,1787	0,7813 ± 0,2770
Cre2 / NAA	0,328	0,7533 ± 0,3607	0,8637 ± 0,2789

Tabela 7.1: Comparação estatística entre as concentrações absolutas e relativas (ao NAA), além de seus valores médios obtidos para controles e pacientes.

Observa-se uma diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles para a razão Cre/NAA ($p = 0,048$). Como o valor-p encontrado para esta razão é menor do que 0,05, a Hipótese Nula, que diz que as médias são iguais, deve ser rejeitada. Portanto, tem-se, com 95% de confiança, que as médias da razão Cre/NAA dos grupos controle e de pacientes não são iguais. Para as outras variáveis não foram verificadas diferenças significantes.

Este resultado indica que há uma provável variação da creatina no cerebelo de pacientes com distonia em relação aos indivíduos controles. Embora a creatina, na maioria dos casos, se mantenha constante no tecido cerebral, em algumas patologias pode haver alterações em sua concentração. Alguns estudos citam a variação da creatina, havendo uma diminuição do seu nível nos casos de tumores [6] e AVC [6, 15], sendo que neste último caso, a alteração do nível da creatina está associada às condições anaeróbicas do tecido cerebral. Já um aumento do nível da creatina acontece nos casos

de distrofia miotônica, sendo este aumento associado ao acréscimo do conteúdo glial, ou seja, de células do Sistema Nervoso Central responsáveis pela sustentação e por funções metabólicas dos neurônios [6, 14].

Como a fosfocreatina atua como reservatório para a geração de ATP, a creatina serve de indicação para o estado energético [6]. Assim, as alterações apresentadas por este metabólito nos pacientes com distonias comparado aos indivíduos controles indicam que ocorrem alterações no cerebelo relacionadas com o metabolismo energético.

Este resultado vem ao encontro de estudos recentes que sugerem o envolvimento do cerebelo na causa da distonia. Na distonia primária, estudos de imagem mostraram ativação cerebelar anormal durante tarefas senso-motoras [16]. Para obter mais informações sobre as distonias, novos estudos funcionais do cerebelo devem ser realizados.

8. Conclusão

Este trabalho permitiu a avaliação dos metabólitos no cerebelo de pacientes com distonia utilizando $^1\text{H-MRS}$ *in vivo*. A partir dos princípios físicos da ressonância magnética, pode-se obter um espectro com o qual se é capaz de identificar os metabólitos presentes no cérebro humano. Os metabólitos analisados nas quantificações, utilizando o método AMARES foram o NAA, a Cre e a Cho. A análise estatística, feita por meio do teste-t, mostrou um resultado significativo para a razão Cre/NAA ($p = 0,048$). Este resultado indica que há uma variação entre a creatina no cerebelo dos pacientes com distonias em relação aos indivíduos controles. Já para os outros metabólitos não foram obtidos resultados significantes.

A variação da creatina nos pacientes com distonia está associada a provável alteração do estado energético do cerebelo dos mesmos, pois a creatina total está relacionada com o metabolismo e estado bioenergético do SNC. Este resultado está de acordo com os recentes estudos sobre o envolvimento de atividades anormais do cerebelo como possíveis causadoras das distonias. Novos estudos poderão fornecer mais conhecimentos a respeito do cerebelo e de seu envolvimento nas distonias.

9. Referências Bibliográficas

- [1] Castellano G, Baena SPC, Dias CSB, Li ML. Espectroscopia de RM Dinâmica para Estudo do Cérebro. In: Li LM, Fernandes PT, Covolan RJM, Cendes F (Org). Neurociências e epilepsia (Série CInAPCe, 1/2008). 1 ed. São Paulo: Editora Plêiade, 2008, v. 1, p. 125-145.
- [2] de Graaf RA. In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques, 2ª edição. John Wiley & Sons, 2007.
- [3] Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design. John Wiley & Sons, 1999.
- [4] Baena SPC. Quantificação Automática de Sinais de MRS do Cérebro *in vivo* para a Classificação de Tumores. Dissertação de mestrado, Instituto de Física Gleb Wataghin, UNICAMP, 2008.
- [5] Salibi N, Brown MA. Clinical MR Spectroscopy – First Principles. New York, 1998.
- [6] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. NMR in Biomedicine 13: 129–153, 2000.
- [7] Puts NAJ, Edden RAE. In vivo magnetic resonance spectroscopy of GABA: A methodological review. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 60: 29–41, 2012.
- [8] National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Dystonia fact sheet. http://www.ninds.nih.gov/disorders/dystonias/detail_dystonias.htm. Acessado em 30/05/2012.
- [9] Geyer HL, Bressman SB. The diagnosis of dystonia. Lancet Neurol 2006; 5: 780-790.
- [10] Associação Brasileira de Portadores de Distonias. O que é distonia? Tratamentos. <http://www.distonia.com.br>. Acessado em 30/05/2012.

[11] Portal da Saúde – SUS. Distonias.

http://portal.saude.gov.br/portal/sctie/visualizar_texto.cfm?idtxt=23526. Acessado em 30/05/2012.

[12] Delmaire C, Vidailhet M, Elbaz A, et al. Structural abnormalities in the cerebellum and sensorimotor circuit in writer's cramp. *Neurology* 2007; 69: 376-380.

[13] Ross B, Bluml S. Magnetic Resonance Spectroscopy of the Brain. *Anat Rec* 2001; 265: 54-84.

[14] Chang L, Ernst T, Osborn D, Seltzer W, PhD; Leonido-Yee M, Poland RE. Proton Spectroscopy in Myotonic Dystrophy.

[15] Maniega SM, Cvorovic V, Armitage PA, Marshall I, Bastian ME, Wardlaw JM. Choline and Creatine Are Not Reliable Denominators for Calculating Metabolite Ratios in Acute Ischemic Stroke.

[16] Roze E, Kishore A, Russo M. Cerebellum and Cortical Plasticity: the Case of Dystonia.

[17] Easton VJ, McColl JH, Statistics Glossary.

http://www.stats.gla.ac.uk/steps/glossary/hypothesis_testing.html#ts. Acessado em 01/06/2012.

Minha orientadora concorda com o expressado neste relatório e deu a seguinte opinião:

“A aluna fez um bom trabalho. Os resultados encontrados neste já foram publicados como resumos em dois eventos internacionais.”